

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-9968

(43) 公開日 平成9年(1997) 1月14日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	C
// (C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 R 1:69)				
(C 1 2 P 21/02				

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-163579

(22) 出願日 平成7年(1995) 6月29日

(71) 出願人 000204686

大関株式会社

兵庫県西宮市今津出在家町4番9号

(71) 出願人 591081631

国税庁長官

東京都千代田区霞が関3丁目1番1号

(72) 発明者 峰時 俊貴

兵庫県西宮市今津出在家町4番9号 大関

株式会社総合研究所内

(72) 発明者 尾関 健二

兵庫県西宮市今津出在家町4番9号 大関

株式会社総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糸状菌のエンハンサーDNA塩基配列およびその用途

(57) 【要約】

【目的】 糸状菌宿主において使用される有効かつ新規なエンハンサーDNA塩基配列を得る。

【構成】 DNA塩基配列単位(-CGGNNATTTA-)を含有するDNA塩基配列、該配列を導入した改良プロモーター、プラスミド、および該プラスミドを用いるポリペプチド製造法。

【効果】 糸状菌宿主において使用される有効かつ新規なエンハンサーDNA塩基配列、これを導入したプロモーター、そのプロモーターを含む発現用プラスミド、およびそれを用いた有用タンパク質ならびにペプチドの製造法が提供される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列-CGGNNATTTA-を含有するエンハンサーDNA塩基配列。

【請求項2】 NNがGCである請求項1記載のエンハンサーDNA塩基配列。

【請求項3】 配列-CCAATCAGCGT-を含有するエンハンサーDNA塩基配列。

【請求項4】 請求項1または3記載の配列を含有するエンハンサーDNA塩基配列。

【請求項5】 NNがGCである請求項4記載のエンハンサーDNA塩基配列。

【請求項6】 請求項1または3記載のエンハンサーDNA塩基配列を、1個または複数個、糸状菌で機能するプロモーター領域に導入したことを特徴とする改良プロモーター。

【請求項7】 プロモーター領域が糸状菌由来の加水分解酵素遺伝子、または、解糖系酵素遺伝子のプロモーター領域である請求項6記載の改良プロモーター。

【請求項8】 プロモーター領域が、配列番号：2で示されるアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) 由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子のプロモーター領域、あるいは、その部分配列を含むプロモーター領域である請求項6記載の改良プロモーター。

【請求項9】 請求項6記載の改良プロモーターを有し、宿主糸状菌の形質転換体の選択に好適なマーカー遺伝子を有し、ターミネーターを有し、大腸菌で複製可能なDNA領域を有する、糸状菌におけるポリペプチド発現用プラスミド。

【請求項10】 マーカー遺伝子が糸状菌由来の硝酸還元酵素遺伝子、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼ遺伝子、またはアセトアミダーゼ遺伝子である請求項9記載のプラスミド。

【請求項11】 マーカー遺伝子が、アスペルギルス属由来の硝酸還元酵素遺伝子である請求項9記載のプラスミド。

【請求項12】 ターミネーターが、配列番号：3で示されるアスペルギルス・オリゼ由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子のターミネーター、あるいは、その部分配列を含むターミネーターである請求項9記載のプラスミド。

【請求項13】 ポリペプチドをコードするDNAをプロモーターおよびターミネーターの間に有する請求項9記載のプラスミド。

【請求項14】 請求項13記載のプラスミドを糸状菌に導入し、得られた形質転換体を培養することよりなるポリペプチドの製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、糸状菌を宿主として有用タンパク質およびペプチドを効率的に生産するために

有効な新規エンハンサーDNA塩基配列、これを導入したプロモーター、そのプロモーターを含む発現用プラスミドおよびそれを用いた有用タンパク質ならびにペプチド製造法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 遺伝子組み換えによる有用タンパク質の宿主としては、これまで大腸菌や酵母が主に用いられてきた。しかし、大腸菌では、異種タンパク質を高発現させた場合、菌体内に不溶性のタンパク質を形成したり、真核生物のタンパク質に特徴的な糖鎖の付加などの翻訳後修飾が起こらず、活性のあるタンパク質を得るために少なからず困難を伴うという欠点がある。また、酵母では、糖鎖の付加は起こるが、生産量が低いという問題があった。

【0003】 一方、糸状菌は、菌体外に各種の酵素タンパク質を多量に分泌生産し、例えば工業的に利用されているアスペルギルス・ニガーの株ではグルコアミラーゼを培養液1リットル当たり20g以上、また、アスペルギルス・オリゼでも $\alpha$ -アミラーゼを固体培養で1kg当たり50g程度生産するといわれており、セルラーゼ生産菌であるトリコデルマ・リーセイも同レベルの酵素生産性を有しているので、同種はもちろん異種タンパク質についても高分泌生産の可能性を秘めていると期待されている。また、アスペルギルス・オリゼやアスペルギルス・ニガーなどのように醸造食品の製造や食品加工用酵素の生産に利用されているものが多く、これらの糸状菌は各種関係機関、例えば、アメリカ食品薬品局 (FDA) において宿主として安全であると評価されており、これらの糸状菌による有用タンパク質生産も認可されやすいと考えられる。

【0004】 このような点から、大腸菌や、酵母に代わる微生物として、糸状菌を遺伝子工学の宿主として、様々なタンパク質の生産が近年報告されるようになってきた。遺伝子工学により目的のタンパク質を生産する場合、その生産効率は、使用するプロモーターによる転写量、転写後の翻訳効率、発現したタンパク質の糖鎖付加などの翻訳後修飾、遺伝子のコピー数、宿主プロテアーゼによるタンパク質の分解など様々な因子によって規制されるが、まず第一に、目的タンパク質の転写量が多くなければ、転写量以上の発現分泌は望むべくもない。この観点から、いかにして強力なプロモーターを取得するかが大きな問題となるため、糸状菌においても種々のプロモーターが単離され、これらを用いて目的タンパク質の生産が報告されている。その代表例としてアスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーター [Biotechnology, 5, 368(1987)]、アスペルギルス・オリゼの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のプロモーター [Biotechnology, 6, 1419(1988)]、トリコデルマ・リーセイのセロビオハイドラーゼ I 遺伝子のプロモーター [Biotechnology, 7, 596(1989)] 等があげられる。

【0005】しかしながら、糸状菌の遺伝子工学に関する研究は、他の微生物に比べて遅れており、プロモーターに関する遺伝子発現機構は、まだほとんど解明されておらず、ここ数年でようやく報告例が増えてきているのが現状である。例えば、炭素源の利用に関する遺伝子の発現制御に関係しているカタボライト抑制遺伝子

[Mol. Microbiol., 7, 847-857(1993)]あるいは、広く真核生物の遺伝子発現調節領域で見い出されるCCAAT配列の結合因子[Mol. Gen. Genet., 235, 81(1992)]に関する研究などがあげられるに過ぎない。したがって、糸状菌による有用タンパク質の生産は、使用するプロモーターの本来の発現制御に依存しており、目的に応じたプロモーターを選択して利用しているのが現状であり、プロモーターの発現調節力を改良してより有用なプロモーターを取得する試みは、現在まで行われていない。したがって、プロモーターの改良技術が提供されれば、新規高発現プロモーターを単離することなく、既存のプロモーターを改良することにより、より有用性の高いプロモーターが取得できるのみならず、そのプロモーターの発現制御も可能となり、有用タンパク質のより効率的な生産が可能となる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、プロモーターの発現制御に関する解析、例えば、エンハンサー核酸塩基配列を同定し、このエンハンサー配列の機能を解明することにある。さらに、これを利用してプロモーターを改良し、このプロモーターを用いた発現プラスミドを構築し、このプラスミドを用いて糸状菌を形質転換することによるタンパク質発現系を開発することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明者らは鋭意研究を行い、アスペルギルス・オリゼの $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子(aqdA)のプロモーターを単離し、このプロモーターの詳細な解析を行った結果、正の発現調節に深くかかわっている新規エンハンサー核酸塩基配列を見出し、このエンハンサー配列をプロモーターに複数個導入することにより、プロモーターの転写活性の増大および炭素源に対する依存性の排除に成功した。さらに、この改良プロモーターと選択マーカーとして硝酸還元酵素遺伝子(niaD)を用いて有用タンパク質およびペプチドを効率的に発現せしめるための新規発現プラスミドを構築した。また、このプラスミドを用いて糸状菌を形質転換し、有用タンパク質、例えば、 $\alpha$ -グルコシダーゼの高生産株、あるいは、任意の生産性を有する形質転換体を取得することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち本発明は、(1) 配列- CGG NNATTTA-を含有するエンハンサーDNA塩基配列、(2) NNがGCである(1)記載のエンハンサー

-DNA塩基配列、(3) 配列- CCAATCAGC GT-を含有するエンハンサーDNA塩基配列、(4)

(1)または(3)記載の配列を含有するエンハンサーDNA塩基配列、(5) NNがGCである(4)記載のエンハンサーDNA塩基配列、および(6)

(1)または(3)記載のエンハンサーDNA塩基配列を、1個または複数個、糸状菌で機能するプロモーター領域に導入したことを特徴とする改良プロモーター、

(7) プロモーター領域が糸状菌由来の加水分解酵素遺伝子、または、解糖系酵素遺伝子のプロモーター領域である(6)記載の改良プロモーター、(8) プロモーター領域が、配列番号: 2で示されるアスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子のプロモーター領域、あるいは、その部分配列を含むプロモーター領域である(6)記載の改良プロモーター、ならびに(9) (6)記載の改良プロモーターを有し、宿主糸状菌の形質転換体の選択に好適なマーカー遺伝子を有し、ターミネーターを有し、大腸菌で複製可能なDNA領域を有する、糸状菌におけるポリペプチド発現用プラスミド、(10) マーカー遺伝子が糸状菌由来の硝酸還元酵素遺伝子、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼ遺伝子、またはアセトアミダーゼ遺伝子である

(9)記載のプラスミド、(11) マーカー遺伝子が、アスペルギルス属由来の硝酸還元酵素遺伝子である

(9)記載のプラスミド、(12) ターミネーターが、配列番号: 3で示されるアスペルギルス・オリゼ由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子のターミネーター、あるいは、その部分配列を含むターミネーターである(9)

記載のプラスミド、(13) ポリペプチドをコードするDNAをプロモーターおよびターミネーターの間に有する(9)記載のプラスミド、さらに(14) (13)記載のプラスミドを糸状菌に導入し、得られた形質転換体を培養することによるポリペプチドの製造法。を提供する。なお、特許請求の範囲および発明の詳細な説明に記載の配列中、Nはヌクレオチドを示し、Aはアデニン、Tはチミン、Cはシトシン、Gはグアニンを表す。また、本明細書においては、これらの配列において、左側が5'末端側、右側が3'末端側として示してあるが、逆方向の配列であっても本発明のエンハンサー機能を発揮するものであり、特に断らない限り、この表記をもって両方のエンハンサー配列を示すものとする。以下、本発明について詳しく説明する。

【0009】まず、アスペルギルス・オリゼの $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子(aqdA)のプロモーターの単離を行った。すなわち、 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子を含むプラスミドpTGF-1[特開平第6-62868号]を材料にして、プロモーター、ターミネーターを含む $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子(aqdA)の全塩基配列を決定するために、デレーションクローンの作製をキロシークエンス用デレーション

キット（宝酒造社製）を用いて行い、これらのクローンの塩基配列をジデオキシ法により決定した。決定された全塩基配列からプロモーター領域（配列番号：2）、 $\alpha$ -グルコシダーゼコード領域（配列番号：1）、ターミネーター領域（配列番号：3）をそれぞれ決定後、プロモーター領域のエンハンサー核酸塩基配列候補の検索を遺伝子解析ソフトを用いて、アスペルギルス・オリゼの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子（amyB）〔Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1849-1853(1992)〕あるいは、グルコアミラーゼ遺伝子（glaA）〔Curr. Genet., 22, 85-91(1992)〕のプロモーターと比較することにより行った。

【0010】その結果見い出されたエンハンサー候補配列の機能を確認するために、まず、aqdA遺伝子のプロモーターのサブクローニングと各種デレクションプロモーター（図4）を構築した。次に、構築された各種デレクションプロモーターを用いてaqdAプロモーターの発現に必要なエンハンサー配列を同定するために、この各種デレクションプロモーターにレポーター遺伝子としての大腸菌の $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子（uidA）を結合した融合遺伝子を構築し、この融合遺伝子と、aqdAターミネーター、選択マーカーとしてのアスペルギルス・オリゼの硝酸還元酵素遺伝子（niaD）からなる、種々のプロモーター活性測定用プラスミド（図2）を構築した。このプラスミドを用いて、アスペルギルス・オリゼの硝酸還元酵素欠損株を公知の方法〔Agric. Biol. Chem., 51, 323-328(1987)〕により形質転換し、得られた形質転換体のサザン解析を行い、その中から宿主のniaD遺伝子座に相同的に1コピー、インテグレートされ、染色体に組み込まれるときの位置効果と導入されるコピー数の影響を受けずに、正確にプロモーター活性を測定できる形質転換体を選択した。これら選択された形質転換体の $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）活性を公知の方法〔Proc. Natl. Sci. USA, 83, 8447-8451(1986)〕に準じて測定することにより、aqdAプロモーター上のエンハンサー配列を同定した。

【0011】すなわち、図4に示す結果から、aqdAプロモーター上のXhoI-EcoRV領域にエンハンサー配列が存在し、さらに、この領域中にエンハンサー候補配列が含まれており、このエンハンサー候補配列およびその上流と下流の配列を特異的に欠失させたとき、aqdAデレクションプロモーター6および7の活性は激減することから、このデレクションプロモーターで欠失している配列（図1）がエンハンサー核酸塩基配列であると同定した。すなわち、DNA塩基配列単位B（5'-CGGGCATTTA-3'）および塩基配列単位C（5'-CCAA TCAGCGT-3'）を含むエンハンサー核酸塩基配列を提供するに至った。

【0012】さらに、エンハンサー塩基配列BおよびCを含むDNA塩基配列単位E（図1）をaqdAプロモーターに1個導入し、合計2個のDNA塩基配列単位Eを含

むaqdAプロモーターのQJS活性は、約3倍増加することを示す（図5）ことから、この塩基配列単位Eもまたエンハンサー機能を有することを確認した。

【0013】また、エンハンサー配列Bの5'末端から4および5塩基目をamyBプロモーター、glaAプロモーターに存在する配列-AA-に置換した配列E（AA）あるいは、他の任意の塩基に置換した配列E（TC）、配列E（CG）のいずれの配列を導入した場合にも、プロモーター活性は2倍以上増加することを示した（図5）。

【0014】以上の結果より、エンハンサー配列Bの5'末端から4および5塩基目の塩基配列は、-GC-に特定されることなく、どの塩基に置換されてもエンハンサー作用を示すことが確認された。すなわち、塩基配列の揺らぎを含む配列A（5'-CGGNNATTTA-3'）は、エンハンサー機能を有することが確認された。以上の如く、新規エンハンサー核酸塩基配列が提供された。

【0015】さらに、本発明は、上述の如く提供された新規エンハンサー核酸塩基配列を糸状菌で機能するプロモーターに導入することによるプロモーター活性の改良を提供するものである。

【0016】エンハンサー配列を導入するプロモーターとしては、糸状菌において機能するものであれば特に制限されないが、具体的には、 $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、セロビオハイドラーゼ、アセトアミダーゼ等の加水分解酵素遺伝子、3-ホスホグリセレートキナーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ等の解糖系酵素遺伝子のプロモーターが挙げられる。好適なプロモーターは、アスペルギルス属の $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼの遺伝子から単離することができる。より好適には、アスペルギルス・オリゼの $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子のプロモーターが挙げられる。そのプロモーターの全塩基配列は、配列番号2で示されるが、その部分配列であっても糸状菌におけるプロモーターとしての機能を有する限り本発明に含まれる。

【0017】本エンハンサー核酸塩基配列のプロモーターへの導入部位は、プロモーター領域であれば特に制限されるものではない。また、導入方法は、例えば以下のようにして行うことができる。まず、導入したいプロモーター領域を適当な2種類の制限酵素〔A〕、〔B〕で消化する。ただし、〔A〕は平滑末端を生じる酵素を用いる。なければ〔A〕の末端をDNAブランディングキット（宝酒造社製）を用いて平滑末端化する。次に、5'末端から制限酵素サイトを〔B〕・〔A〕の順で付加したプライマーと制限酵素サイトを付加しないプライマーを用いて、エンハンサー配列を含む断片をPCR法により増幅する。このようにして増幅した断片を上述の如く

消化したプロモーターに挿入することにより、平滑末端サイトと制限酵素Bサイトでそれぞれ結合される。結合後、平滑末端サイトの制限酵素認識サイトは消失されるが、もう一方のサイトには[B]・[A]のサイトが存在する。エンハンサー配列を2個以上導入する場合には、1個導入されたプロモーターを制限酵素[A]と[B]で消化後、以下、同様の方法で順次エンハンサー配列を導入することにより成し遂げられる。また、導入するエンハンサー配列の個数により、任意の転写活性を持つプロモーターの構築が可能となる。さらに、具体的な例として図6に示す如くエンハンサー配列を導入した $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子のプロモーターは、転写活性が増加するのみならず、グルコース抑制を受けず、炭素源に影響されない恒常的に高発現するプロモーターに改良された。すなわち、プロモーターの発現制御の改良にも成功するに至った。

【0018】さらに、本発明の新規発現プラスミドは、上述の如く改良された糸状菌で機能するプロモーターと、ターミネーターを有し、宿主の形質転換体の選択に好適なマーカー遺伝子を有し、大腸菌で複製可能なDNA領域を有するものである。

【0019】ターミネーターは、糸状菌において機能するものであれば特に制限されないが、具体的には、配列番号3に示されるアスペルギルス・オリゼの $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子のターミネーター、あるいは、その部分配列を含むターミネーターがより好適に用いられる。

【0020】好ましい選択マーカーとしては、硝酸還元酵素(niaD)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ(argB)、トリプトファンシンターゼ(trpC)、アセトアミダーゼ(amdS)の遺伝子が挙げられる。ただし、宿主糸状菌は、選定された選択マーカーについての機能的遺伝子を有しない株を用いなければならない。より好適な選択マーカー遺伝子は、硝酸還元酵素遺伝子(niaD)である。niaD遺伝子を選択マーカーとして用いる場合には、このマーカーに対して遺伝子に欠損を有する糸状菌のniaD株を宿主として用いなければならない。このniaD変異株は、アンクルらの方法[Mol. Gen. Genet., 218, 99-104(1989)]により取得することができる。このniaD遺伝子を選択マーカーとして用いることにより、宿主の染色体のniaD遺伝子座に相同的にインテグレートされる形質転換体を取得することが容易になる。すなわち、インテグレートされる位置による発現の影響は排除されるため、目的とする有用タンパク質の発現は、インテグレートされるコピー数に規定されるのみである。従って、本発明の発現プラスミドのプロモーターへのエンハンサー配列の導入個数の調整と、niaD遺伝子により選択された形質転換体のコピー数をサザン解析で調べることにより、有用タンパク質の高生産のみならず、任意の生産力を持つ形質転換体の取得が可能となる。さらに、アスペルギルス属、例えばアスペルギルス

・オリゼのniaD遺伝子は、多くの糸状菌、例えばアスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・ニドランス、ペニシリウム・クリソゲナムなどで機能を有する[Mol. Gen. Genet., 218, 99-104(1989)]ため、種々の糸状菌を宿主として利用することが可能である。

【0021】本プラスミドの構築は、例えば以下のようにして行うことができる。大腸菌ベクター、例えばpUC18のマルチクローニングサイトにniaD遺伝子を含むプラスミドFpSTA14[Mol. Gen. Genet., 218, 99-104(1989)]から適当な制限酵素で切り出したniaD遺伝子を挿入する。次に、使用するターミネーター領域を適当な制限酵素で切り出すか、あるいは、PCR法により増幅して、上記のプラスミドに挿入する。得られたプラスミドに前述の方法で構築したエンハンサー配列を導入したプロモーターを適当な制限酵素で切り出して、ターミネーター領域に隣接して挿入する。このようにして発現プラスミドが構築できる。さらに、具体的な例として図8に示す手順で構築されたプラスミドpNAG136、pNAG142が挙げられる。これらのプラスミドは、発現させるべき目的のタンパク質をコードするDNA断片を、プロモーターとターミネーターの間に挿入するとき利用できる制限酵素サイトを増やす目的で、8種類の制限酵素認識サイトを導入してある。

【0022】本発明は、さらに、目的とする有用タンパク質あるいはペプチドを、糸状菌を宿主として製造する方法をも開示するものである。これは、例えば次のステップにより成し遂げられる。まず、目的タンパク質をコードするDNAの開始コドン上流と終止コドン下流に適当な制限酵素サイトを部位特異的変異法[Proc. Natl. Sci. USA, 82, 488(1985)]あるいは、PCR法によりそれぞれ導入し、これらの制限酵素サイトを両端に持つDNA断片を発現プラスミド例えばpNAG136あるいは、pNAG142に挿入する。または、目的タンパク質の遺伝子のターミネーターが糸状菌で機能する場合は、タンパク質のコード領域とターミネーター領域を含むDNA断片を、同様な方法で調製してプロモーターに連結することも可能である。この様にして得られた形質転換ベクターを用いて、このベクターに含まれる選択マーカーに対して遺伝子に欠損を有する糸状菌を公知の方法[Agric. Biol. Chem., 51, 323-328(1987)]により形質転換する。次に、選択マーカーに対する選択培地で生育できる形質転換体を取得後、この形質転換体を適当な培地、培養条件で培養し、目的のタンパク質を生産させる。生産された目的のタンパク質は、適当な方法で定性、定量し、また、必要に応じて単離・精製される。

【0023】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の実施例はこれらに限られるものではない。なお、本実施例で使用した制限酵素およびその他の遺伝子操作用酵素は、宝酒造または東洋紡績の製品を用

い、これらの酵素の反応条件は製品購入時に添付される説明書に従った。

【0024】実施例1  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子のプロモーター領域とターミネーター領域の同定と塩基配列  
アスベルギルス・オリゼRIB40株の $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子を含む7.0kbのPstI部位に挿入したプラスミドpTGF-1〔特開平6-62868〕を材料に用いた。

【0025】まず、 $\alpha$ -グルコシダーゼを含む5.0kbのScaI断片をpTGF-1から取得し、この断片にEcoRIリンカーを付加した後、プラスミドpUC118のEcoRI部位に正、逆両方向に挿入してそれぞれ得られたプラスミドpTGS-1とpTGS-2を用いて、 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子の全塩基配列を決定するために、デレーションクローンの作成をキロシークエンス用デレーションキット（宝酒造社製）を用いて行った。具体的には、pTGS-1あるいは、pTGS-2をSmaIとPstIで切断し、エキソヌクレアーゼIIIによる消化、マングベーンヌクレアーゼによる平滑末端化、クレーノフラグメントによる末端修復後、ライゲーションして各鎖長のデレーションプラスミドを作成した。これらのデレーションプラスミドから1本鎖DNAを調製し、ジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467(1977)〕により自動シークエンサー370A（アブライド バイオシステムズ社製）を用いて、塩基配列を決定した。決定した配列中の約3.2kb HindIII-EcoRV領域中に $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子のコード領域が存在することが確認されており〔特開平6-62868〕、また、糸状菌におけるイントロンのコンセンサス配列〔「The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi」IRL Press, Oxford, pp93-139(1987)〕に一致する配列を3ヶ所見出した。以上の結果より、配列番号1に示す985アミノ酸からなる $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子のコード領域を含む全塩基配列が決定された。

【0026】次に、5'側上流に存在するScaI部位よりさらに上流のプロモーター領域の塩基配列を決定するために、pTGF-1〔特開平6-62868〕の1.5kb PstI-SalI断片をプラスミドpUC118あるいは、pUC119のマルチクローニング部位のPstI, SalI部位に挿入した。そのプラスミドから1本鎖DNAを調製し、デレーションプラスミドの時と同様にジデオキシ法により自動シークエンサーを用いて塩基配列を決定した。以上の結果より配列番号2に示す720bpのプロモーター領域の塩基配列を決定した。

【0027】また、 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子の終止コドン（TGA）より3'下流のターミネーター領域の塩基配列は、デレーションプラスミドにより決定された5.0kb ScaI断片中に十分な長さが含まれており、配列番号3に、終止から840bpのターミネーター領域の塩基配列を示す。

【0028】実施例2 新規エンハンサー候補の検索  
 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子（aqdA）のプロモーター領域中に存在する未知のエンハンサー配列を同定するため

に、まず、プロモーターのホモロジー検索をDNAS1 S遺伝子解析ソフト（日立ソフトウエアエンジニアリング社製）を用いて行った。一般的に高発現、高分泌することが知られているアスベルギルス・オリゼの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子（amyB）のプロモーター〔Biosci. Biotech. Biochem., 56,1849-1853(1992)〕あるいは、グルコアミラーゼ遺伝子（glAA）のプロモーター〔Curr. Genet., 22, 85-91(1992)〕と比較したところ、プロモーター領域全体としてのホモロジーはamyBのプロモーターと51%、glAAのプロモーターと52%のホモロジーを示したが、特にホモロジーの高い領域は見つからなかった。そこで、次に、aqdAのプロモーターを20-50bp単位に分割してより詳細なホモロジー検索をしたところ、図1に示す（5'-CGGGCTAAAT-3'）の配列と高ホモロジーの配列（5'-CGGAATTTTA-3'）が、amyBプロモーターとglAAプロモーターで発見された。また、この過程でamyBプロモーターとglAAプロモーターで共通に保存されている2つの公知の領域Region I, II〔Curr. Genet., 22, 85-91(1992)〕もまた、aqdAプロモーター領域に存在することが確認された。

【0029】実施例3  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子プロモーターのサブクローニングと各種デレーションプロモーターの構築

ホモロジー検索で見つかった配列（5'-CGGGCTAAAT-3'）のエンハンサー作用の有無、あるいは、それ以外のエンハンサー部位を同定するために、aqdAプロモーターのサブクローニングをPCR法を用いて行った。

【0030】配列番号2に示すaqdAプロモーターの存在位置17から718の702bpを増幅するためにPstIサイトを付加した上流プライマーとして、

SSP: 5'-GGCTCCAGTCATGCCACCACTAGAGATG-3'

SalIサイトを付加した下流プライマーとして、

3ASP: 5'-CCGTCGACCGTCGTCCGCCAAGTTGATT-3'

をDNA合成機モデル391 PCR-MATE（アブライド バイオシステムズ社製）を用いて合成した。上記の2つのプライマーとテンプレートとしてプラスミドpTGF-1を用いてサーマル・サイクラー（パーキンエルマー・ジャパン社製）により、aqdAプロモーターのPstI-SalI断片を取得し、この断片をpUC118のマルチクローニングサイトに挿入してaqdAプロモーターを含むプラスミドpAGP1（図1）を取得した。

【0031】次に、このpAGP1を用いて図4に示すようなaqdAの各種デレーションプロモーターを構築した。具体的には、例えば、pAGP1をPstI, EcoT14Iで消化した後、0.8%アガロース電気泳動にかけ分離した約3.8kb PstI-EcoT14I断片をジーンクリーンキット（バイオ101社製）を用いて回収した。この断片をDNAブランチングキット（宝酒造社製）を用いて平滑末端化後、セルフライゲーションする事により、aqdAデレーションプロモ

ーター2 (P-aqda2) を含むプラスミド pAGP2 を取得した。以下、pAGP1 を PstI と XhoI、EcoRV、あるいは、FbaI で二重消化した後、同様な方法で aqda デレージョンプロモーター3、4、あるいは、5 を含むプラスミド pAGP3、4、あるいは、5 をそれぞれ取得した。

【0032】ホモロジー検索の結果見つかった amvB プロモーターと glbA プロモーターに相同性の高い塩基配列 (5'-CGGGCTAAAT-3') だけを欠失させた aqda デレージョンプロモーター6 (P-aqda6) は、コンピネーションPCR法 [「PCRTechnology」, Stocton Press, New York, pp.61-70(1989)] を用いて取得した。具体的には、まず、高ホモロジー配列を欠失した内部上流プライマーとして、

5ISP: 5'-CCGTCGTGTCGGGGATGGACCAATCAGC-3'

同じく内部下流プライマーとして、

3IASP: 5'-CATCCCCGACACGACGCTTGAGCCCTGA-3'

を合成した。

【0033】次に、aqda プロモーターのサブクローニングの時に合成した上流プライマー5SPと内部下流プライマー3IASPを用いてPCR産物1を増幅し、同じく内部上流プライマー5ISPと下流プライマー3ASPを用いてPCR産物2を増幅した。得られたPCR産物1と2を混合してテンプレートとし、上流プライマー5SPと下流プライマー3ASPを用いて3回目のPCR反応をGene Amp<sup>TM</sup> kit (パーキンエルマー・ジャパン社製) を用いて下記の反応溶液中で行った。

H <sub>2</sub> O	70.5μl
10x反応溶液	10μl
dNTP mix(1,25mM)	16μl
上流プライマー5SP(0.1mM)	1μl
下流プライマー3ASP(0.1mM)	1μl
PCR産物1	1μl(5-100ng)
PCR産物2	1μl(5-100ng)
Amplitaq <sup>TM</sup> DNAポリメラーゼ	0.5μl

反応条件は (94°C, 0.5分) → (55°C, 1分) → (72°C, 2分) で25サイクル行った。PCR増幅後の反応溶液は、フェノール・クロロホルム処理後、エタノール沈澱で回収し、PstI、SalIで処理した後、0.8%アガロース電気泳動に供し、aqda デレージョンプロモーター6 (P-aqda6) を単離・精製した。このデレージョンプロモーターを PstI、SalI で処理した pUC118 に挿入して P-aqda6 を含むプラスミド pAGP6 を取得した。

【0034】同様なコンピネーションPCR法を用いて、図1に示すような相同性の高い塩基配列のすぐ下流領域3とすぐ上流領域1だけを欠失させた aqda デレージョンプロモーター7 (P-aqda7) あるいは、8 (P-aqda8) をそれぞれ取得して PstI、SalI 処理した pUC118 にそれぞれ挿入して、pAGP7 あるいは、pAGP8 を取得した。また、コンピネーションPCR法により得たデレージョンプロモーターは、目的の配列が欠失していることをジデ

オキシ法により塩基配列を調べることで確認した。

#### 【0035】実施例4 プロモーター活性測定用プラスミドの構築

構築された各種 aqda デレージョンプロモーターを用いて aqda プロモーターの発現に必要なエンハンサー配列を同定するため、aqda ターミネーターと選択マーカーとしての アスベルギルス・オリゼの硝酸還元酵素遺伝子 (niaD) とレポーター遺伝子としての大腸菌 (E. coli) の β-グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子 (uidA) からなるプロモーター活性測定用プラスミド pNAGT4 (図2) を構築した。

【0036】まず、硝酸還元酵素遺伝子 (niaD) を含むプラスミド pSTA14 [Mol. Gen. Genet., 218, 99-104(1989)] を XhoI、HindIII で消化後、0.8%アガロース電気泳動に供し、niaD を含む 4.4kb の XhoI-HindIII 断片を単離・精製した。この断片を DNA ブランディングキット (宝酒造社製) を用いて平滑末端化した後、EcoRI 処理後同じく平滑末端化処理した pUC118 に挿入して pNR10 を得た。

【0037】次に、pNR10 に β-グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子 (uidA) を挿入するために、pBI221 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8447-8451(1986)] の GUS 遺伝子の 5' 上流の SmaI サイトで消化し、これに SalI リンカーを付けセルフライゲーションした後、次に、3' 下流の SacI サイトで消化後、平滑末端化して XbaI リンカーを付け同様にセルフライゲーションして pBI221-SX を得た。この pBI221-SX から GUS 遺伝子を含む約 1.9kb の SalI-XbaI 断片をアガロース電気泳動を用いて同様に単離・精製した後、pNR10 のマルチクローニングサイトの SalI、XbaI サイトに挿入してプラスミド pNRG1 を得た。

【0038】この pNRG1 に α-グルコシダーゼ遺伝子 (aqda) のターミネーター (T-aqda) を挿入するために、まず、ターミネーターを PCR 法により取得した。配列番号3に示す aqda ターミネーターの存在位置8から837の830bpを増幅するために XbaI サイトを付加した上流プライマーとして、5TSP: 5'-CCTCTAGAAGCGTAACAGGATAGCCTAG-3'

SmaI サイトを付加した下流プライマーとして、

3TASP: 5'-GGCCCGGAGTAACCCATTCCCGTTCT-3'

を DNA 合成機モデル391 PCR-MATE (アプライド バイオシステムズ社製) を用いて合成した。上記2つのプライマーとテンプレートとしてプラスミド pTGF-1 を用いてサーマル・サイクラー (パーキンエルマー・ジャパン社製) により aqda ターミネーターの XbaI-SmaI 断片を取得した。この断片を XbaI、SmaI 消化した pNRG1 に挿入してプロモーター活性測定用プラスミド pNAGT4 を得た。

#### 【0039】実施例5 形質転換体の取得

上述の通り得られた pNAGT4 に各種 aqda デレージョンプロモーターを挿入して得られたプラスミドを用いてアスベルギルス・オリゼの形質転換体を取得した。

【0040】まず、前述の各種aqdデレクションプロモーターを含むプラスミドのうちpAGP2、3、4、5は、SalIとNaeIで消化後、アガロース電気泳動を用いてデレクションプロモーターを含むSalI-NaeI断片を単離・精製した。また、SalIとPstIで処理したpAGP1、6、7、8から同様にして、デレクションプロモーターを含むSalI-PstI断片を単離・精製した。

【0041】次に、pNAGT4をSalI、NaeI消化、あるいは、SalI、PstI消化し、同様にそれぞれの制限酵素で処理されたpNAGT4を単離・精製した後、使用した制限酵素

10

に対応する各デレクションプロモーター断片をpNAGT4にそれぞれ導入することにより、pNAGG1-1からpNAGG1-8の8種類のプラスミドを得た。図2にその一例を示す。  
【0042】次に、以上得られたpNAGG1シリーズのプラスミドによるアスペルギルス・オリゼの形質転換を行った。アスペルギルス・オリゼの硝酸還元酵素欠損株(niaD<sup>-</sup>)、例えば、niaD14株[Mo1. Gen. Genet., 218, 99-104(1989)]をデキストリン・ペプトン培地(2% デキストリン、1% ポリペプトン、0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05% MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O)で30°C、3日間振とう培養した後、得られた菌

20

体を滅菌水で洗浄した。この菌体を細胞壁溶解液[10mM リン酸緩衝液、pH 6.0、0.8M NaCl、20mg/ml ヤタラゼ(宝酒造社製)]に懸濁し、30°C、2~3時間緩やかに振とうすることによりプロトプラスト化した。得られたプロトプラストをガラスフィルターで濾過することにより残存する菌体を除去した。

【0043】次に、このプロトプラストを用いて五味らの方法[Agric. Biol. Chem., 51, 323-328(1987)]によりコンピテントセルの調製および形質転換を行い、単一窒素源として硝酸を含む培地、例えば、ツァベック・ド

30

ックス培地(0.2% NaNO<sub>3</sub>、0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.05% KCl、0.05% MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、2% グルコース、pH 5.5)で生育可能な形質転換体をそれぞれのプラスミドにつき各12株ずつ合計96株取得した。

【0044】実施例6 各種デレクションプロモーターのβ-グルクロニダーゼ活性

得られた各種形質転換体のサザン解析を行い、その中から、相同的に1コピー、インテグレートされた株を選択して、β-グルクロニダーゼ(GUS)活性を測定した。

【0045】まず、サザン解析を行うために、染色体DNAの調製を行った。形質転換体の分生孢子1白金耳をデキストリン・ペプトン培地(2% デキストリン、1% ポリペプトン、0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1% NaNO<sub>3</sub>、0.05% MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O) 100mlに接種し、30°C、3日間振とう培養後、得られた菌体を3G1ガラスフィルターで集め滅菌水で洗浄した。この菌体の水分を濾紙により除去した後、あらかじめ-80°Cに冷却した乳鉢を用いて液体窒素中ですりつぶした。この菌体破砕物をTE溶液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH 8.0)に懸濁した後、溶菌液(0.5% SDS、5

50

放置した。得られた溶菌液を3000rpm、20分間冷却遠心分離後、上清を取得した。その上清を等量のフェノール・クロロホルム混合液で2回処理して、夾雑するタンパク質を除去後、2.5倍容の冷エタノールを加えDNAを沈殿させた。この沈殿物を0.1mg/mlのRNaseを含むTE溶液に緩やかに溶解して30°C、30分間反応した。この溶液をフェノール・クロロホルム処理した後、2.5倍容の冷エタノールを添加し、生じた染色体DNAをバスツールピペットで巻き取った。巻き取ったDNAを乾燥後、TE溶液に溶解し、染色体DNA溶液を調製した。得られた染色体DNAをSalIで消化後、アガロース電気泳動で分離しナイロンメンブレン、例えば、ハイボンDN(アマシャム社製)にブロットした後、プラスミドpUC18をプローブとしてサザン解析を行った。この時、ECLランダムプライムDNAラベリング・検出システム(アマシャム社製)を用いてプローブのラベリングおよびシグナルの検出を行った。その結果、形質転換に用いたプラスミドに含まれる各デレクションプロモーターのサイズに依存した9.3kbから8.9kbのシングルバンドの検出、あるいは、このシングルバンドに加え、プラスミドのサイズに相当する11.0kbから10.6kbにもハイブリダイズして合計2本のバンドが検出される場合の2通りのパターンが存在した。この結果は、図3に示すように、1本のバンドの場合は1コピー、2本のバンドのばあいには2コピー以上、宿主のniaD遺伝子座に相同的にインテグレートされていることを意味している。

【0046】形質転換に用いたプラスミドは、選択マーカー遺伝子としてniaD遺伝子を含んでおりこの選択マーカー単独で形質転換した場合は、高頻度で相同的にインテグレートされる[Mo1. Gen. Genet., 218, 99-104(1989)]ことが明らかになっているが、これに新たに導入したい別の遺伝子を含むプラスミドを用いて形質転換した場合にも、導入される遺伝子の影響を受けずに、niaD遺伝子座で相同的にインテグレートされることが明らかとなった。また、ごく希にniaD遺伝子座で2重交差による組み換えを生じ、niaD遺伝子のみがインテグレートされるパターンも存在した。

【0047】サザン解析の結果より、プロモーター活性の測定に適した形質転換体、即ち、相同的に1コピーだけインテグレートされ、染色体に組み込まれる時の位置効果と導入されるコピー数の影響を受けずに、正確にプロモーター活性を測定できる形質転換体を、使用したプラスミドにつき任意に2株ずつ合計16株選択した。

【0048】次に、選択された16株の分生孢子5x10<sup>6</sup>個をツァベック・ドックス・ポリペプトン培地(1% ポリペプトン、0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.05% MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.05% KCl、0.01% FeSO<sub>4</sub>、2% グルコース、pH 5.5) 15mlに接種し、30°C、3日間振とう培養後、得られた菌体を3G1ガラスフィルターで集めた。この菌体の水分を濾紙で除去した後、約0.2gの菌体を-80°Cに冷却した乳鉢を用いて



液体窒素中ですりつぶした。この菌体破砕物を0.8mlの抽出溶液(50mM リン酸緩衝液、pH 7.0、10mM EDTA、0.1% Triton X-100、0.1% Sarkosyl、10mM  $\beta$ -メルカプトエタノール)に懸濁後、約1分間激しく攪拌することにより酵素を抽出後、15000rpm、15分間、遠心分離して菌体残さを除去した上清を酵素溶液とした。得られた酵素液中の $\beta$ -グルクロニダーゼ(GUS)活性は、公知の方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8447-8451(1986)]に準じて、1mlの反応溶液(50mM リン酸緩衝液、pH 7.0、0.1% Triton X-100、10mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、1mM p-ニトロフェニルグルクロニド)中で37°Cで酵素液5 $\mu$ lから50 $\mu$ lを反応させ、415nmの吸光度を測定することにより行った。なお、この時の活性は、デレクションしていない本来の $\alpha$ -グルコシダーゼプロモーター(P-aqdA1)により生産されたGUS活性を100%とする相対活性で示した。その結果を図4に示す。

【0049】aqdAプロモーターを5'上流領域から欠失させた場合、P-aqdA1とP-aqdA2の間の領域(PstI-EcoT14I)とP-aqdA3とP-aqdA4の間の領域(XhoI-EcoRV)の2ヶ所で大きな活性低下が見られた。その内、PstI-EcoT14I領域中には、公知の保存配列RegionI[Curr. Genet., 22, 85-91(1992)]が存在していた。また、XhoI-EcoRV領域中には、ホモロジー検索の結果見出された塩基配列B(5'-CGGGCATTTA-3')が含まれていた。さらに、上記の配列Bだけを欠失したデレシオンプロモーター(P-aqdA6)の活性もまた激減していることから、aqdAプロモーターに存在する塩基配列Bは、新規なエンハンサーであることが確認された。また、エンハンサー配列Bの前後の塩基配列だけをそれぞれ欠失したプロモーターP-aqdA7とP-aqdA8のうち、P-aqdA7の相対活性は1%しか示さず、ここで欠失した配列C(5'-CCAATCAGCGT-3')もまたエンハンサー配列であることが確認された。

#### 【0050】実施例7 新規エンハンサー配列の多様性の決定

新規なエンハンサー配列であることが確認された塩基配列B(5'-CGGGCATTTA-3')と保存性の高い配列が、実施例2で行ったホモロジー検索の結果、 $\alpha$ -アミラーゼプロモーターとグルコアミラーゼプロモーターにも存在することが確認されており、これらの配列もまた、エンハンサー機能を持つかどうかを確認するために、配列Bと異なる塩基部分を任意の塩基と置換した配列を、aqdAプロモーターに挿入したプロモーターを作成して、そのプロモーター活性を測定した。

【0051】まず、実施例3で取得したaqdAプロモーター(0.7kb PstI-SalI断片)を含むプラスミドpAGP1を用いてaqdAプロモーターのEcoRVとClaIサイトを制限酵素処理した後、DNAブランディングキット(宝酒造社製)を用いて平滑末端化し、セルフライゲーションすることによりエンハンサー配列を含まないEcoRV-ClaI断片を除

去したaqdAデレシオンプロモーター131(P-aqdA131)を含むプラスミドpAGP131を取得した(図5)。次に、図5に示すエンハンサー配列BおよびCを含むDNA塩基配列E(具体的配列は図4に示す)を除去したEcoRV-ClaI断片の代わりに挿入するために、この配列EをPCR法により取得した。具体的には、上流プライマーとして、

5SPE: 5'-TCAAGCGTCGTGTCGGCATT-3'

ClaIサイトを付加した下流プライマーとして、

3ASPE: 5'-CCATCGATGATATCCCTACGCTGATTGG-3'

をDNA合成機モデル391 PCR-MATE(アプライド バイオシステムズ社製)を用いて合成した。上記の2つのプライマーとテンプレートとしてプラスミドpTGF-1を用いてサーマル・サイクラー(パーキンエルマー・ジャパン社製)により増幅した。この増幅された配列EをaqdAプロモーターに挿入するために、P-aqdA131の時と同様にaqdAプロモーターをEcoRVとClaIで消化し、アガロース電気泳動を用いてEcoRV-ClaI断片を除去した。これと配列Eをライゲーションすることにより配列Eを挿入したプロモーター131GC(P-aqdA132GC)を含むプラスミドpAGP132-GCを得た。

【0052】次に、エンハンサー配列Bの5'末端から4塩基目と5塩基目がAAに置換された配列(5'-CGGAAATTTA-3')、即ち、 $\alpha$ -アミラーゼ(amyB)プロモーターとグルコアミラーゼ(glaA)プロモーターに共通する配列を含む配列E(AA)をP-aqdA131GCと同様に、aqdAプロモーターに挿入するために配列E(AA)のPCR増幅を行った。上流プライマーとして、

30 5SPE-AA: 5'-TCAAGCGTCGTGTCGGAAATT-3'

を合成し、下流プライマーは、配列E増幅で使ったプライマー3ASPEを用いて今までと同様にサーマル・サイクラーにより増幅した。この増幅された配列E(AA)をP-aqdA132GCの時と同様な方法でaqdAプロモーターに挿入して、プロモーター132AA(P-aqdA132AA)を含むプラスミドpAGP132-AAを取得した。また、それ以外にも、エンハンサー配列Bの5'末端から4塩基目と5塩基目が、-TC-、あるいは-CG-に置換された配列を含む配列E(TC)あるいは配列E(CG)を上述と同様な方法でPCRを用いて増幅した後、aqdAプロモーターに挿入してプロモーター132TC(P-aqdA132TC)あるいは、プロモーター132CG(P-aqdA132CG)を含むプラスミドpAGP132-TCあるいは、pAGP132-CGを取得した。

【0053】以上得られた5種類のプラスミドをPstI、SalIで処理後、種々の改変aqdAプロモーターを含むPstI-SalI断片をアガロース電気泳動により単離・精製した。この断片を実施例4で構築したプロモーター活性測定用プラスミドpNAGT4(図2)のPstI、SalIサイトに挿入して、pNAGG1-131、-132GC、-132AA、-132TCそして-1

17

32CGを得た。つぎに、これらのプラスミドを用いて実施例5で示した方法でアスベルギルス・オリゼの形質転換体を各々のプラスミドにつき、各6株ずつ合計30株取得した。これらの形質転換体のサザン解析を実施例6の方法で行い、硝酸還元酵素遺伝子(niaD)座で相同的に1コピー、インテグレートされ、染色体に組み込まれる位置効果と導入されるコピー数の影響を受けない形質転換体を任意に2株ずつ選択した。選択された形質転換体を実施例6の方法に従い、ツァベック・ドックス・ポリペプトン培地での培養後、液体窒素による菌体破碎、破碎菌体からの酵素の抽出、抽出酵素液のβ-グルクロニダーゼ(GUS)活性測定を行うことにより改変プロモーターの活性を測定した。

【0054】その結果、エンハンサー配列BおよびCを含むDNA塩基配列EをaqdAプロモーターに導入した改変プロモーター132GC(P-aqdA132GC)のGUS活性は、コントロールのP-aqdA131と比べて2.7倍の上昇を示し、エンハンサー配列BおよびCを含む配列Eは、プロモーター活性を増強する能力を有することが確認された。また、エンハンサー配列Bの5'末端から4および5塩基目をamyBプロモーター、qlaAプロモーターに存在する配列-AA-に置換した配列E(AA)あるいは、他の任意の塩基に置換した配列E(TC)、配列E(CG)のいずれの配列を導入した場合にもプロモーター活性は2倍以上増加することを示した。以上の結果より、エンハンサー配列Bの5'末端から4および5塩基目の塩基配列は、-G-C-に特定されることなくどの塩基に置換されてもエンハンサー作用を示すことが確認された。すなわち、塩基配列の揺らぎを含む配列A(5'-CGGNNAATTTA-3')は、エンハンサー機能を有することが示された。

#### 【0055】実施例8 エンハンサー配列の導入によるプロモーターの改良

2塩基の揺らぎを含むエンハンサー配列A(5'-CGGNNAATTTA-3')とエンハンサー配列Cを含むDNA塩基配列EをaqdAプロモーターに複数個導入することにより、プロモーター活性の改良を行った。

【0056】まず、実施例7で構築したプロモーターP-aqdA132GCは、配列Eが1個導入されたプロモーターであり、この時導入される配列Eの5'末端は平滑末端で結合し、結合後EcoRVの認識サイトは消失する。一方、3'末端は配列Eに元々含まれるEcoRVサイトに加えPCRのときにClaIサイトが付加されているため、結合後、図5あるいは、6に示すように2つの制限酵素サイトが存在する。このEcoRV、ClaIサイトを利用して複数個タンデムに配列Eを順次導入していった。具体的には、P-aqdA132GCを含むプラスミドpAGP132-GCをEcoRV、ClaIで消化し、これに実施例7でPCR増幅した3'末端にEcoRV、ClaIサイトを持つ配列Eを導入して、pAGP133を構築した。このpAGP133をEcoRV、ClaIで消化し、以

18

下同様に、順次配列Eをプロモーターに導入していき、最高11個導入し、合計12個、配列Eがタンデムに存在するプロモーターP-aqdA142までを含むプラスミドを構築した。これらのプラスミドの中から配列Eが4個、6個、12個存在するプロモーターを含むプラスミドpAGP134、136、142をPstI、SalIで消化後、これらの改良プロモーターをアガロース電気泳動で単離・精製し、PstI、SalIサイトを両端に持つ改良プロモーターを実施例4で構築したプロモーター活性測定用プラスミドpNAGT4(図2)のPstI、SalIサイトに挿入してpNAGG1-134、-136、142を取得した。

【0057】次に、改良されたaqdAプロモーターの対照としてアスベルギルス・オリゼのグルコアミラーゼ遺伝子(aqdA)のプロモーターを用いて、これにレポーター遺伝子としてのGUS遺伝子を連結したプラスミドをaqdAプロモーターの場合と同様に構築した。具体的には、まず、公知のqlaAプロモーター塩基配列[Curr. Genet., 22, 85-91(1992)]から以下に示すプライマーを合成してqlaAプロモーター(P-qlaA)をサブクローニングした。PstIサイトを付加した上流プライマーとして、

SSGP: 5'-CGCTGCAGACCTACCTAAAGCAAAGT-3'

SalIサイトを付加した下流プライマーとして、

SASGP: 5'-CCGTCGACTGCTTCGACTTCGTTTCGTG-3'

これらのプライマーを用いてqlaAプロモーター(P-qlaA)を含むプラスミド、例えば、pRGA-1[Gene, 108, 145-150(1991)]をテンプレートとしてPCR増幅を行い、qlaAプロモーター(P-qlaA)の0.7kb PstI-SalI断片を取得し、実施例4で構築したプロモーター活性測定用プラスミドpNAGT4のPstI、SalIサイトに挿入してpNAGG1を構築した。次に、これらのプラスミドを用いて実施例5で示した方法で形質転換体を各々のプラスミドにつき各6株ずつ合計24株取得し、これらの形質転換体のサザン解析を実施例6の方法で行い、niaD遺伝子座で相同的に1コピー、インテグレートされた形質転換体を任意に2株ずつ選択した。選択された形質転換体から実施例6の方法に従い菌体培養、酵素の抽出を行い、抽出酵素液のβ-グルクロニダーゼ(GUS)活性測定を行うことにより、改良プロモーターの活性を測定した。

【0058】この結果、図6に示すように、配列Eをプロモーターにタンデムに導入するに従いGUS活性は増加し、P-aqdA142では、配列Eが1個存在するP-aqdA131に比べて3.5倍のプロモーター活性の増強が確認された。さらに、本来、高発現プロモーターとして有用なqlaAプロモーターと比べても3倍以上のプロモーター活性を示し、エンハンサー配列をプロモーターに導入する方法は、非常に有効であることが確認された。

#### 【0059】実施例9 改良プロモーターの炭素源に対する有効性

エンハンサー配列Eをタンデムに複数個導入することにより高発現化されたプロモーターP-aqdA142の炭素源に

対する有効性を試験するために、種々の炭素源を含む培地で生育した菌体のGUS活性を測定した。

【0060】実施例6で使用した改良前の本来のaqdAプロモーター (P-aqdA1) にGUS遺伝子を連結した融合遺伝子が1コピー、インテグレートされた形質転換体および実施例8で使用した改良プロモーター (P-aqdA142) あるいは、glAプロモーター (P-glA) とGUS遺伝子の融合遺伝子が1コピー、インテグレートされた形質転換体、各々2株、合計6株の分生胞子 $1 \times 10^6$ 個をツァベック・ドックス・ポリペプトン培地 (1% ポリペプトン、0.1%  $K_2HPO_4$ 、0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.05%  $KCl$ 、0.01%  $FeSO_4$ 、2% グルコース、pH 5.5) あるいは、この培地のグルコースを表1に示す各種の炭素源に置換した培地15mlに接種し、30°C、3日間振とう培養後、実施例6の方法に従い、菌体破碎、酵素抽出を行い、抽出酵素液のGUS活性を測定した。その結果を表1に示す。

【0061】

【表1】

炭素源	GUS活性 (U/mg-protein)		
	P-aqdA1	P-aqdA142	P-glA
グルコース	57.3	614	236
マルトース	130	864	700
マルトリオース	109	706	596
イソマルトース	146	799	645
可溶性澱粉	144	820	670

【0062】改良プロモーター (P-aqdA142) は、本来のプロモーター (P-aqdA1) に比べてグルコースで10倍以上、他の炭素源でも5~6倍、高活性を示した。さらに、P-aqdA142は、glAプロモーター (P-glA) に比べても供試したいずれの炭素源においても高活性を示した。また、glAプロモーターあるいは、本来のaqdAプロモーターは、グルコース抑制の影響を受けるため、炭素源グルコースのときの活性は極端に低下する特徴を有するが、改良プロモーターでは、グルコースにおいても他の炭素源の約80%の相対活性を保持していた。この結果は、エンハンサー配列を複数個導入することにより改良されたプロモーターP-aqdA142は、炭素源に影響されず、恒常的に高発現することを意味しており、その有用性は非常に高く、プロモーターの発現制御機能もまた、改良できることを示した。

【0063】実施例10 改良プロモーターのノーザン解析

実施例8で構築された改良プロモーターP-aqdA142によりGUS活性の顕著な増加が確認されたが、この活性増加が、プロモーターの転写活性の増加、すなわち、GUS遺

伝子 (uidA) のmRNAの増加のためであるかどうかの確認を行った。

【0064】実施例8で構築したエンハンサー配列Eが1個だけ存在するプロモーター (P-aqdA131) 4個存在するプロモーター (P-aqdA134) あるいは、12個存在する改良プロモーター (P-aqdA142) とGUS遺伝子の融合遺伝子が1コピー、インテグレートされた形質転換体の分生胞子 $1 \times 10^6$ 個をツァベック・ドックス・ポリペプトン培地100mlに接種し、30°C、3日間振とう培養後、ガラスフィルターで集菌し、滅菌水で洗浄した。洗浄菌体約2.0gを炭素源がグルコースあるいは、マルトースのツァベック・ドックス・ポリペプトン培地100mlに移した後、さらに、30°C、12時間振とう培養した菌体をガラスフィルターで集め、滅菌水で洗浄した。この洗浄菌体の水分を濾紙で除去後、約2.0gの菌体を-80°Cに冷却した乳鉢を用いて液体窒素中ですりつぶし、この菌体破碎物に6mlのグアニジンイソチオシアネート溶液 (5M グアニジンイソチオシアネート、10mM EDTA、50mM Tris-HCl、pH 7.5) と0.6mlのβ-メルカプトエタノールを加え懸濁溶液を調整後、公知の方法 [DNA, 2, 329-335(1983)] に準じてRNAを調製した。このRNAの20μgをホルムアルデヒド・アガロースゲル電気泳動で分離後、ナイロンメンブレン例えば、ハイボンDN (アマシャム社製) へ、トランスブロットした後、トランスイルミネーターを用いて紫外線照射することによりメンブレン上にRNAを固定した。次に、プラスミドpBI221-SX (図2) から調製した1.9kb XbaI-SalI断片のGUS遺伝子 (uidA) とメンブレンをハイブリダイゼーション溶液 (5xSSPE、5x Denhardt's溶液、50% ホルムアミド、0.5% SDS、100μg/ml 熱変性鮭精子DNA) 中で42°C、17時間ハイブリダイズさせた後、適当な洗浄溶液、例えば、6xSSCあるいは、0.2xSSC、0.1% SDSでメンブレンを洗浄した。このメンブレンとハイブリダイズしたシグナルはX線フィルム上で検出された。

【0065】この結果、図7に示すように、炭素源グルコース、マルトースいずれの場合においても、エンハンサー配列が1個のプロモーター (P-aqdA131) より12個存在するプロモーター (P-aqdA142) の方が、多量のGUS遺伝子 (uidA) のmRNAが検出された。これは、aqdAプロモーターにエンハンサー配列を複数個導入することによりプロモーターの転写活性が増加したことを意味しており、GUS活性の増加は、P-aqdA142のプロモーター機能が改善された結果であることが確認された。

【0066】実施例11 高発現ベクターpNAG136とpNAG142の構築

硝酸還元酵素遺伝子 (niaD) を選択マーカーに持ち、高発現プロモーターP-aqdA136あるいは、P-aqdA142とaqdAターミネーターの間にマルチクローニングサイト (MCS) を導入した汎用性のある高発現ベクターpNAG136あるいは、pNAG142を図8に示す手順で構築した。

21

【0067】まず、配列番号3に示すaqdAターミネーターの存在位置8から585の578bpを増幅するために、実施例4で合成したXbaIサイトを付加した上流プライマー5TSPとSmaIサイトを付加した下流プライマー、

3TASP-2: 5'-GGGACGTGTACGCTTGGTAAAGT-3'

をDNA合成機モデル391 PCR-MATE (アプライド バイオシステムズ社製)を用いて合成した。これらのプライマーを用いてプラスミドpTGF-1 [特開平6-62868]をテンプレートとしてPCR増幅を行い、aqdAターミネーターの0.6kb XbaI-SmaI断片を取得した。この断片を実施例4で構築したniaD遺伝子を含むプラスミドpNR10のマルチクローニングサイト(MCS)のXbaI、SmaIサイトに挿入してプラスミドpNRT10を構築した。このプラスミドのPstI、SalIサイトに、実施例8で構築したエンハンサー配列を6個あるいは、12個もつ高発現プロモーターP-aqdA136あるいは、P-aqdA142のPstI-SalI断片をそれぞれ挿入して、pNAG136xsあるいは、pNAG142xsを取得した。

【0068】次に、aqdAターミネーター(T-aqdA)と高発現aqdAプロモーター(P-aqdA136あるいは、P-aqdA142)の間にマルチクローニングサイトを導入するために、まず、マルチクローニングサイトとして使用可能な制限酵素の検索を行った。すなわち、高発現ベクターの構成要素であるniaD遺伝子、aqdAターミネーター(T-aqdA)、高発現プロモーター(P-aqdA136あるいは、P-aqdA142)、pUC118のいずれにも存在しない制限酵素の検索を行った結果、pNAG136xsあるいは、pNAG142xsで利用できるXbaI、SalI以外に新たに、NdeI、NotI、PmaCI、SpeIが使用できることが確認された。また、高発現aqdAプロモーターの5'末端に存在するHindIII、SphIを除去すれば、これらの制限酵素も使用できるため、pNAG136xsあるいは、pNAG142xsをHindIII、SphIで消化し、DNAブラunchingキット(宝酒造社製)を用いて平滑末端化した後、セルフライゲーションすることにより、HindIII、SphIサイトを除去した。次に、上述の検索の結果、使用可能な8種類の制限酵素(両端はXbaIとSalI)からなるマルチクローニングサイト(図8)をDNA合成機を用いてセンス鎖、アンチセンス鎖をそれぞれ合成し、これらを混合後、(94°C、1分間)→(55°C、10分間)インキュベート後、氷冷することによりアニールさせ2本鎖のマルチクローニングサイトを取得した。合成した1本鎖DNAは以下に示す。

【0069】センス鎖: 5'-CTAGAGCATGCCATATGAC TAGTCACGTGCCGCCGCCAAGCTTG-3'

アンチセンス鎖: 5'-TCGACAAGCTTCCGCCGCCACGTGACTAGT CATATGCCATGCT-3'

【0070】ここで得られたマルチクローニングサイトの5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)を用いてリン酸化した後、HindIII、SphIを除去したpNAG136xs、pNAG142xsのXbaI、SalIサイトに挿入することにより、pNAG136とpNAG142を構築した。

22

## 【0071】実施例12 アスベルギルス・オリゼのα-グルコシダーゼ高生産株の取得

実施例8で構築したエンハンサー配列Eを複数個aqdAプロモーターに導入することにより高発現プロモーターに改良されたP-aqdA136あるいは、P-aqdA142によるα-グルコシダーゼ(AGL)高生産株を育種するために、まず、形質転換用プラスミドpNAG136あるいは、pNAG142を構築した。その構築手順を図9に示す。

【0072】実施例8で構築した改良プロモーターP-aqdA136あるいは、P-aqdA142を含むプラスミドpAGP136あるいは、pAGP142をCpoI、BamHIで消化後、アガロース電気泳動で単離・精製した。次に、α-グルコシダーゼ遺伝子(aqdA)を含むプラスミドpTGF-1 [特開平6-62868]をCpoI、BamHIで処理し、aqdAのコード領域およびターミネーター領域を含む3.8kb CpoI-BamHI断片を、同様に単離・精製した。この断片を前述のCpoI、BamHI処理したプラスミドに挿入してpAGL136あるいは、pAGL142を構築した。これらのプラスミドをPstI、SmaIで消化後、4.4kbあるいは、4.7kbの改良aqdAプロモーターに連結されたaqdA遺伝子のPstI-SmaI断片を単離・精製し、この断片を実施例4で構築した選択マーカーとしての硝酸還元酵素遺伝子(niaD)を含むプラスミドpNR10のPstI、SmaIサイトに挿入することにより、形質転換プラスミドpNAG136あるいは、pNAG142を構築した。

【0073】次に、これらのプラスミドを用いて実施例5で示した方法でアスベルギルス・オリゼの硝酸還元酵素欠損株(nia14)の形質転換を行い、約300株の形質転換体を取得後、高生産株のスクリーニングを以下に述べる方法で行った。形質転換体の分生孢子1白金耳を、0.05% 4-ニトロフェニル-α-D-グルコシド(4NPG)を含むツァベック・ドックス寒天培地(0.2% NaNO<sub>3</sub>、0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.05% KCl、0.05% MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、2% グルコース、1.5% 寒天、pH 5.5)に接種し、生育した菌体コロニーの周辺の色が、分泌されたα-グルコシダーゼの作用により基質である4NPGが分解され生じた4-ニトロフェノールのために黄色に変化し始める時間および色の強さを指標に、スクリーニングを行った。このスクリーニングにより、活性の強い十数株を選択し、次に、これらの形質転換体のサザン解析を行い、コピー数の最も多い株をスクリーニングした。また、同時に、活性の弱い任意の数株についてもサザン解析を行った。なお、染色体DNAの調製は、実施例6の方法に従って行った。ここで得られた染色体DNAをXhoI、SalIで消化後、アガロース電気泳動で分離し、ナイロンメンブラン、例えば、ハイボンドN(アマシャム社製)にブロットした後、3.8kb CpoI-BamHI断片のaqdA遺伝子をプローブとしてサザン解析を行った。この時、ECLランダムプライムDNAラベリング・検出キット(アマシャム社製)を用いてプローブのラベリングおよびシグナルの検出を行った。

【0074】その結果、図10に示すように、アスペルギルス・オリゼが本来持っている $agdA$ に相当する7.1kbのバンドが共通して検出され、それ以外に、使用した高発現プロモーターの長さに依存した8.0kbあるいは、8.9kbのバンドが検出され合計2本のシグナルが存在する $niaD$ 遺伝子座で相同的に1コピー、インテグレートしている株、あるいは、この2本のシグナルに加えさらに、使用した形質転換プラスミド(pNAGL136あるいは、pNAGL142)のサイズに相当する12.0kbあるいは、12.3kbのバンドもまた検出され合計3本のシグナルが存在する相同的に2コピー以上、インテグレートしている株、の2通りのパターンが検出された。また、プレートスクリーニングで活性の強かった形質転換体は、いずれも2コピー以上インテグレートされており、この中から、12.0kbのシグナルの最も強い株AGL136-60は、4から5コピー、12.3kbのシグナルの最も強い株AGL142-72は、3から4コピー、それぞれインテグレートされていると推定された。

【0075】次に、上記のAGL136-60株とAGL142-72株、それに加えて、形質転換に使用したプラスミドから得られた1コピーおよび2コピー株をそれぞれ2株ずつ選択した、これら10株の形質転換体の $\alpha$ -グルコシダーゼ(AGL)活性を測定した。

【0076】選択された10株と親株 $niaD14$ の分生孢子\*

AGL 導入		AGL 活性 (U/mg-protein)		CD-P 培地	
形質	コピー数	グルコース/マルトース			
転換株		DP 培地	CD-P 培地		(相対活性：%)
		グルコース	マルトース		
136-10	1	1.73	2.69	3.06	88
136-54	1	1.87	2.98	3.42	87
136-32	2	4.13	4.29	5.90	73
136-50	2	3.65	4.91	5.85	84
136-60	4-5	5.21	5.07	6.04	84
-----					
142-95	1	2.85	2.87	4.40	65
142-172	1	2.48	3.21	5.00	64
142-107	2	5.51	5.39	6.39	84
142-158	2	5.47	5.33	6.74	79
142-72	3-4	6.15	6.15	7.37	83
-----					
niaD14	0	0.065	0.038	0.246	15

【0078】形質転換体のAGL活性は、いずれの培地で培養した場合でも親株より非常に高く、例えば、1コピー、インテグレートされるだけでDP培地の時AGL142-95株で40倍以上増加した。また、AGL136株、AGL142株のいずれの形質転換体においても、インテグレートされた

\* 2白金耳を、デキストリン・ペプトン(DP)培地(2% デキストリン、1% ポリペプトン、0.5%  $KH_2PO_4$ 、0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )あるいは、炭素源が2% グルコースか2% マルトースのツァベック・ドックス・ポリペプトン(CD-P)培地(1% ポリペプトン、0.1%  $K_2HPO_4$ 、0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.05% KCl、0.01%  $FeSO_4$ 、2% 炭素源、pH 5.5)の3種類の培地15mlに接種し、30°C、3日間振とう培養後、ガラスフィルターを用いて菌体を除去した培養濾液を調製した。この培養濾液中の $\alpha$ -グルコシダーゼ(AGL)活性は、反応溶液(20mM 酢酸緩衝液、pH 5.0、0.2% 4-ニトロフェニル- $\alpha$ -D-グルコシド(4NP-G))に適当量、例えば、0.1mlの培養濾液を加え1mlとし、37°Cで任意の時間(1~60分間)反応後、2.0mlの0.5M  $Na_2CO_3$ 溶液を加えて反応を停止して、反応溶液中に遊離してくる4-ニトロフェノール(4NP)を405nmの吸光度の上昇で測定した。1ユニット(U)は、1分間に1  $\mu$ molの4NPを遊離する活性と定義した。また、培養濾液中のタンパク質濃度は、プロテインアッセイ染色液(バイオラッド社製)により定量した。測定結果を表2に示す。

【0077】

【表2】

コピー数が多いほど活性が高く、サザン解析の結果、最もコピー数が多かったAGL136-60株、AGL142-72株では、DP培地で80倍以上、CD-P培地のグルコースの時で130倍以上、マルトースの時で25倍以上活性増加が見られた。また、使用した改良プロモーターの活性は、P-ag

25

da136よりP-agdA142の方が高く、これを反映して同じコピー数の形質転換体では、AGL142株の方が活性が高かった。

【0079】以上の結果は、niaD遺伝子を選択マーカーに用いた場合、相同的にインテグレートされるため、染色体に組み込まれるときの位置効果の影響を受けず、従って、使用するプロモーターの強さと、インテグレートされるコピー数により、任意の酵素活性を持つ形質転換体を取得することが可能であることを意味する。さらに、形質転換体のAGLの炭素源マルトースに対するグルコースの相対活性は、親株では15%しか示さないのに対してほとんどの株で70~80%を示し、これは、改良プロモーターにより生産されるAGLは、グルコース抑制の影響をほとんど受けないことを意味する。

【0080】また、これらの形質転換体の培養濾液について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、 $\alpha$ -グルコシダーゼと同様の分子量のタンパク質が明らかに増大していることを確認した。

【0081】

【発明の効果】本発明のエンハンサーDNA塩基配列を\*20

26

\*糸状菌で機能するプロモーターに導入することにより、プロモーターの転写活性が増加するのみならず、任意の強さのプロモーターを構築でき、さらに、その発現制御機能の改良も可能となり、既存のプロモーターをより有用なプロモーターに改良できる。また、このようにして改良されたプロモーターを含む発現プラスミドを用いれば、産業上有用な酵素、タンパク質、ポリペプチド等を、安全性が高く高分泌能を有する糸状菌を宿主として、より効率的に大量に製造することが可能となった。また、本発明のエンハンサー配列に関するプロモーターの解析は、少なからず糸状菌の発現制御機構の解明に貢献するものである。

【0082】

【配列表】

【0083】配列番号：1

配列の長さ：3207

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列：

TCCGTTTCTT AAAAGAACAA CTACAACACG GTCCGGAATC AACTTGCCGG ACCACGAC	58
ATG GCC GGT CTA AAA AGC TTC CTT GCC AGT TCT TGG CTG CTA CCA GTG	106
Met Ala Gly Leu Lys Ser Phe Leu Ala Ser Ser Trp Leu Leu Pro Val	
1 5 10 15	
GCT TCG GCG GCG AGT CAA TCT ATC GTT CCT AGC ACT TCG GCA ACA GCG	154
Ala Cys Gly Ala Ser Gln Ser Ile Val Pro Ser Thr Ser Ala Thr Ala	
20 25 30	
GCA TAC TCG CAG TTC ACC ATT CCC GCC TCT GCC GAT GTG GCG GCG AAT	202
Ala Tyr Ser Gln Phe Thr Ile Pro Ala Ser Ala Asp Val Gly Ala Asn	
35 40 45	
TTG GTC GCC AAC ATT GAT GAC CCC CAA GCG GTC AAC GCG CAA TCT GTC	250
Leu Val Ala Asn Ile Asp Asp Pro Gln Ala Val Asn Ala Gln Ser Val	
50 55 60	
TGT CCG GCG TAC AAG GCC TCC GAT GTG AAA CAT TCC TCC CAG GGT TTC	298
Cys Pro Gly Tyr Lys Ala Ser Asp Val Lys His Ser Ser Gln Gly Phe	
65 70 75 80	
ACC GCT AGC CTG GAG TTG GCT GGA GAC CCT TGT AAT GTT TAC GGA ACG	346
Thr Ala Ser Leu Glu Leu Ala Gly Asp Pro Cys Asn Val Tyr Gly Thr	
85 90 95	
GAC GTC GAT TCG TTG ACC CTG ACC GTG GAA TAC CAG GCA AAG GAT CGT	394
Asp Val Asp Ser Leu Thr Leu Thr Val Glu Tyr Gln Ala Lys Asp Arg	
100 105 110	
TTG AAC ATC CAG ATT GTT CCG ACG TAT TTT GAC GCC TCC AAT GCA TCT	442
Leu Asn Ile Gln Ile Val Pro Thr Tyr Phe Asp Ala Ser Asn Ala Ser	
115 120 125	
TGG TAC ATT CTT TCG GAA GAG CTA GTG CCC AGA CCA AAG GCT TCC CAA	490
Trp Tyr Ile Leu Ser Glu Glu Leu Val Pro Arg Pro Lys Ala Ser Gln	
130 135 140	
AAT GCA TCG GTT CCT CAG AGT GAT TTT GTT GTC TCT TGG TCC AAC GAA	538

27 28  
 Asn Ala Ser Val Pro Gln Ser Asp Phe Val Val Ser Trp Ser Asn Glu  
 145 150 155 160  
 CCT TCT TTC AAC TTT AAG GTG ATC CGA AAA GCT ACT GGT GAC GTG CTA 586  
 Pro Ser Phe Asn Phe Lys Val Ile Arg Lys Ala Thr Gly Asp Val Leu  
 165 170 175  
 TTC AAC ACA AAG GGC TCT ACC TTA GTC TAC GAG AAT CAG TTC ATA GAA 634  
 Phe Asn Thr Lys Gly Ser Thr Leu Val Tyr Glu Asn Gln Phe Ile Glu  
 180 185 190  
 TTT GTC ACG TTG TTG CCT GAA GAA TAT AAC CTA TAT GGC TTG CGA GAG 682  
 Phe Val Thr Leu Leu Pro Glu Glu Tyr Asn Leu Tyr Gly Leu Gly Glu  
 195 200 205  
 CGG ATG AAC CAG CTG CGG CTA CTG GAG AAC GCT AAT TTG ACG CTA TAT 730  
 Arg Met Asn Gln Leu Arg Leu Leu Glu Asn Ala Asn Leu Thr Leu Tyr  
 210 215 220  
 CCC GCA GAT ATC GCA GAT CCC ATT GAC GA gtacgtatct ggcatttggt gc 781  
 Ala Ala Asp Ile Ala Asp Pro Ile Asp As  
 225 230  
 ggcattttagg ctaatccatg gacctctag T AAC ATC TAT GGA CAT CA 837  
 p Asn Ile Tyr Gly His His  
 235 240  
 GCA TTT TAC TTG GAT ACA ACG TAC TAC AAG GTG GGT GGT CAG AAT AAG 885  
 Ala Phe Tyr Leu Asp Thr Arg Tyr Tyr Lys Val Gly Gly Gln Asn Lys  
 245 250 255  
 AGC CAT ACC ATA GTC AAG AGC AGC GAA GCG GAA CCA TCT CAA GAA TAC 933  
 Ser His Thr Ile Val Lys Ser Ser Glu Ala Glu Pro Ser Gln Glu Tyr  
 260 265 270  
 GTC TCA TAT TCT CAC GGA GTG TTC CTC AGA AAT GCC CAT GGA CAG GAG 981  
 Val Ser Tyr Ser His Gly Val Phe Leu Arg Asn Ala His Gly Gln Glu  
 275 280 285  
 ATC CTC CTG CGG GAT CAA AAG TTG ATC TGG CGC ACT CTG GGA GGA AGC 1029  
 Ile Leu Leu Arg Asp Gln Lys Leu Ile Trp Arg Thr Leu Gly Gly Ser  
 290 295 300  
 GTT GAT CTG ACA TTC TAC TCT GGC CCA ACG CAA GCC GAG GTC ACC AAG 1077  
 Val Asp Leu Thr Phe Tyr Ser Gly Pro Thr Gln Ala Glu Val Thr Lys  
 305 310 315 320  
 CAA TAT CAG CTC AGC ACC GTG GGA CTG CCT GCC ATG CAG CAA TAT AAC 1125  
 Gln Tyr Gln Leu Ser Thr Val Gly Leu Pro Ala Met Gln Gln Tyr Asn  
 325 330 335  
 ACG CTC GGA TTT CAC CAG TGC CGC TGG GGC TAT AAC AAC TGG TCC GAA 1173  
 Thr Leu Gly Phe His Gln Cys Arg Trp Gly Tyr Asn Asn Trp Ser Glu  
 340 345 350  
 TTT GAA GAC GTA CTT GCC AAT TTC GAG AGA TTC GAG ATT CCT TTG GAG 1221  
 Phe Glu Asp Val Leu Ala Asn Phe Glu Arg Phe Glu Ile Pro Leu Glu  
 355 360 365  
 TAC CTC TG gtaagaaaca tggtcgtcgc tcatttcggt tccttctaac gcctatat 1277  
 Tyr Leu Tr  
 370  
 gc ag G GCC GAT ATC GAT TAC ATG CAT GGA TAT GCC AAT TTT GAC 1321  
 p Ala Asp Ile Asp Tyr Met His Gly Tyr Arg Asn Phe Asp  
 375 380

29

30

AAT GAC CAA CAT CGC TTT TCG TAT GAA GAA GGT GAA AAG TTC CTC AAC 1369  
 Asn Asp Gln His Arg Phe Ser Tyr Glu Glu Gly Glu Lys Phe Leu Asn  
 385 390 395 400  
 AAG CTT CAC GCC GGT CGA CGT CGC TGG GTC CCA ATC GTT GAC CGA CCT 1417  
 Lys Leu His Ala Gly Gly Arg Arg Trp Val Pro Ile Val Asp Gly Ala  
 405 410 415  
 CTT TAT ATT CCC AAT CCG GAG AAC GCT TCT GAT CC gtaagtggcc gtctt 1467  
 Leu Tyr Ile Pro Asn Pro Glu Asn Ala Ser Asp Al  
 420 425  
 ccaca tactcttgcc cgtgaacgaa gactcaccgt gattatag T TAC GAA ACT TAT 1523  
 a Tyr Glu Thr Tyr  
 430  
 GAC ACA GGC GCC AAG GAC GAT GTT TTC ATC AAG AAT CCC GAC GCC AGT 1571  
 Asp Arg Gly Ala Lys Asp Asp Val Phe Ile Lys Asn Pro Asp Gly Ser  
 435 440 445  
 CTA TAC ATT GGC GCT GTC TGG CCT GGC TAT ACT GTC TAC CCC GAC TGG 1619  
 Leu Tyr Ile Gly Ala Val Trp Pro Gly Tyr Thr Val Tyr Pro Asp Trp  
 450 455 460  
 CAT CAT CCT AAG GCC TCC GAT TTC TGG GCT AAT GAG CTG GTC ACC TGG 1667  
 His His Pro Lys Ala Ser Asp Phe Trp Ala Asn Glu Leu Val Thr Trp  
 465 470 475 480  
 TGG AAC AAG CTG CAT TAT GAT GCG GTC TGG TAC GAC ATG GCT GAA GTT 1715  
 Trp Asn Lys Leu His Tyr Asp Gly Val Trp Tyr Asp Met Ala Glu Val  
 485 490 495  
 TCT TCC TTC TGC GTA GCG ACC TGC GGA ACT GCG AAT CTG TCA ATG AAC 1763  
 Ser Ser Phe Cys Val Gly Ser Cys Gly Thr Gly Asn Leu Ser Met Asn  
 500 505 510  
 CCG GCT CAT CCA CCG TTC GCT CTC CCC GCG GAA CCA GCG AAC GTC GTC 1811  
 Pro Ala His Pro Pro Phe Ala Leu Pro Gly Glu Pro Gly Asn Val Val  
 515 520 525  
 TAT GAT TAT CCA GAG GCG TTT AAC ATC ACC AAT GCT ACG GAA GCA GCC 1859  
 Tyr Asp Tyr Pro Glu Gly Phe Asn Ile Thr Asn Ala Thr Glu Ala Ala  
 530 535 540  
 TCA GCA TCC GCT GCG GCG GCA AGC CAA TCC GCA GCG GCA TCA TCC ACA 1907  
 Ser Ala Ser Ala Gly Ala Ala Ser Gln Ser Ala Ala Ala Ser Ser Thr  
 545 550 555 560  
 ACT ACA TCA GCC CCC TAC CTG CGT ACA ACA CCT ACC CCC GGA GTT CGT 1955  
 Thr Thr Ser Ala Pro Tyr Leu Arg Thr Thr Pro Thr Pro Gly Val Arg  
 565 570 575  
 AAT GTT GAC CAC CCT CCT TAT GTT ATC AAC CAT GTC CAA CCT GCG CAC 2003  
 Asn Val Asp His Pro Pro Tyr Val Ile Asn His Val Gln Pro Gly His  
 580 585 590  
 GAC CTG ACC GTT CAC GCC ATC TCA CCA AAT TCT ACT CAC TCG GAT GCG 2051  
 Asp Leu Ser Val His Ala Ile Ser Pro Asn Ser Thr His Ser Asp Gly  
 595 600 605  
 GTC CAG GAG TAT GAT GTA CAC AGT CTT TAC GCG CAC CAA GCG ATA AAT 2099  
 Val Gln Glu Tyr Asp Val His Ser Leu Tyr Gly His Gln Gly Ile Asn  
 610 615 620  
 GCA ACC TAT CAC GGA TTG CTC AAG GTG TGG GAG AAC AAA GCG CCC TTT 2147  
 Ala Thr Tyr His Gly Leu Leu Lys Val Trp Glu Asn Lys Arg Pro Phe



31	625	630	635	640	32
	ATC ATC GCA CGC TCT ACA TTT TCC GGC TCT GCG AAA TGG GCC GGC CAC				2195
	Ile Ile Ala Arg Ser Thr Phe Ser Gly Ser Gly Lys Trp Ala Gly His				
	645	650	655		
	TGG GGT GGT GAT AAC TTC TCC AAA TGG GGA TCG ATG TTC TTT TCG ATC				2243
	Trp Gly Gly Asp Asn Phe Ser Lys Trp Gly Ser Met Phe Phe Ser Ile				
	660	665	670		
	TGG CAG GCC CTC CAG TTC TCG CTC TTT GGC ATC CCT ATG TTT GGT GTT				2291
	Ser Gln Ala Leu Gln Phe Ser Leu Phe Gly Ile Pro Met Phe Gly Val				
	675	680	685		
	GAC ACC TGT GGT TTC AAT GGA AAC ACG GAT GAG GAG CTA TGC AAC CGA				2339
	Asp Thr Cys Gly Phe Asn Gly Asn Thr Asp Glu Glu Leu Cys Asn Arg				
	690	695	700		
	TGG ATG CAG CTC TCG GCC TTT TTC CCT TTC TAC CCG AAC CAT AAT GTT				2387
	Trp Met Gln Leu Ser Ala Phe Phe Pro Phe Tyr Arg Asn His Asn Val				
	705	710	715	720	
	CTC TCT GCA ATC CCA CAA GAG CCC TAT CGG TGG GCG TCC GTG ATC GAT				2435
	Leu Ser Ala Ile Pro Gln Glu Pro Tyr Arg Trp Ala Ser Val Ile Asp				
	725	730	735		
	GCC ACG AAG GCG GCA ATG AAC ATT CGA TAC CCT ATT TTG CCG TAC TTT				2483
	Ala Thr Lys Ala Ala Met Asn Ile Arg Tyr Ala Ile Leu Pro Tyr Phe				
	740	745	750		
	TAC ACC CTG TTC CAT TTG GCC CAC ACC ACT GGA TCT ACG GTC ATG CCG				2531
	Tyr Thr Leu Phe His Leu Ala His Thr Thr Gly Ser Thr Val Met Arg				
	755	760	765		
	GCA CTT GCG TGG GAG TTC CCG AAT GAC CCC TCC CTA GCT GCT GTC GCG				2579
	Ala Leu Ala Trp Glu Phe Pro Asn Asp Pro Ser Leu Ala Ala Val Gly				
	770	775	780		
	ACC CAA TTT CTT GTC GGT CCC TCG GTC ATG GTG ATT CCT GTT CTT GAG				2627
	Thr Gln Phe Leu Val Gly Pro Ser Val Met Val Ile Pro Val Leu Glu				
	785	790	795	800	
	CCA CAG GTA GAT ACT GTC CAG GGT GTC TTC CCA GGT GTT GCA CAT CCG				2675
	Pro Gln Val Asp Thr Val Gln Gly Val Phe Pro Gly Val Gly His Gly				
	805	810	815		
	GAA GTC TGG TAC GAC TGG TAC TCT CAA ACA CCT GTT GAT GCA AAG CCC				2723
	Glu Val Trp Tyr Asp Trp Tyr Ser Gln Thr Ala Val Asp Ala Lys Pro				
	820	825	830		
	GGT GTC AAC ACA ACA ATC TCA GCG CCA CTG GCG CAC ATT CCG GTT TTC				2771
	Gly Val Asn Thr Thr Ile Ser Ala Pro Leu Gly His Ile Pro Val Phe				
	835	840	845		
	GTT CGT GGT GGT AGC ATT CTG CCC ATG CAG GAG GTT GCG CTG ACC ACT				2819
	Val Arg Gly Gly Ser Ile Leu Pro Met Gln Glu Val Ala Leu Thr Thr				
	850	855	860		
	CCC GAC GCT CCG AAG ACC CCC TGG TCT TTG CTC GCG TCG CTG AGC AGT				2867
	Arg Asp Ala Arg Lys Thr Pro Trp Ser Leu Leu Ala Ser Leu Ser Ser				
	865	870	875	880	
	AAT GGA ACT GCC TCT GCG CAG CTC TAC CTC GAT GAT GGA GAA AGT GTC				2915
	Asn Gly Thr Ala Ser Gly Gln Leu Tyr Leu Asp Asp Gly Glu Ser Val				
	885	890	895		
	TAC CCC GAG GAT ACG CTT TCT GTG GAC TTC CTG GCG TCT CCG TCC ACT				2963

33 34

Tyr Pro Glu Asp Thr Leu Ser Val Asp Phe Leu Ala Ser Arg Ser Thr  
 900 905 910

CTC CGA GCC TCT GCG CCG GGT ACT TGG AAG GAG GCG AAT CCA CTA GCG 3011  
 Leu Arg Ala Ser Ala Arg Gly Thr Trp Lys Glu Ala Asn Pro Leu Ala  
 915 920 925

AAT GTG ACG GTA CTT GGT GTG ACT GAG AAG CCA TCC TCA GTG ACA CTC 3059  
 Asn Val Thr Val Leu Gly Val Thr Glu Lys Pro Ser Ser Val Thr Leu  
 930 935 940

AAT GCG GAG ACG CTC TCC TCC GAC TCT GTG AAG TAT AAC GCG ACC TCA 3107  
 Asn Gly Glu Thr Leu Ser Ser Asp Ser Val Lys Tyr Asn Ala Thr Ser  
 945 950 955 960

CAC GTT CTC CAC GTT GGT GCG TTG CAG AAG CAC ACA GCG GAT GGA GCA 3155  
 His Val Leu His Val Gly Gly Leu Gln Lys His Thr Ala Asp Gly Ala  
 965 970 975

TGG GCG AAG GAC TGG GTA CTG AAA TGG TGAAGGAAGC GTAACAGGAT AGCCT 3207  
 Trp Ala Lys Asp Trp Val Leu Lys Trp  
 980 985

【0084】配列番号: 2

配列の長さ: 720

配列の型: 核酸

\* 鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

\* 20 配列の種類: Genomic DNA

配列:

CCCATCGGAT GCTCCCGTCA TGGCACCCT AGAGATGGCG TCGAAAACCC TCACCGGCAC 60  
 ACCGGAGGGG TTTACGCACC TTGGAATATG AGGTGGGGAA CGATGTATTT GCCAGTATTG 120  
 ACTCTCGTGA ATGGATCTCT CGAGAAATAC TACCTTTTCA GCGCTCAAGC GTCGTGTCCG 180  
 CCATTTATCG GGGGATGGAC CAATCAGCGT AGCGATATCA GATGATCGCC AGCATTGGTC 240  
 AGGAACGTTT CCAATTTCCG GACACGGAAG TACTGTAAC TCTCCCAAGA ATCAACACAC 300  
 TCTTTTCCGG TCTCGTCTT TGCTCGGCAG AGATTCATCT CCCATCGTCG GCTTAACCGG 360  
 TACTCTTTCG TCACGTTCCA AAAGGCTTGA TCATGCTGTC CCCACTCCGT CCGGGTGAAG 420  
 CCACCTCATT GCTGCGTAGG ACCTATACCC TTCAACTAGC GTGACTTCTT CCCCTCTCAT 480  
 CGTCGAGAGA TTGCAGGCAA TCCCCCTCGG ACGTTTGACG GCGAATGTTT TGCCTTCACG 540  
 CCAGGTAGCA CAAATCGATG GGAACGGGAC GGGCCATCAA TTGTGAGGGA TTTCCCGTGG 600  
 ACACCTCGTT CGTCAAGACA TATACATCTA GCTACAATTC CGTTCCGAG ACGGCAGAGG 660  
 CGTCCGTTTC TTAAGAAGAC AACTACAACA CGGTCCGGA TCAACTTGGC CGACCACGAC 720

【0085】配列番号: 3

配列の長さ: 840

配列の型: 核酸

\* 鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

※ 配列の種類: Genomic DNA

配列:

TGAAGGAAGC GTAACAGGAT AGCCTAGACC CACATACTAT CTGTATACAA CTCCGCAATA 60  
 TGAAGTGATG AATGCAAACT AGCAGCGAAT CGGATATCAG TAGCATAACG TAATCGGTAA 120  
 CCGAGTTGCC CGCGAAGCG AGTTGCCAC CACACGCGTT TTCAACCGC CTCAATTTCT 180  
 TAGATGATTA AAACATCAGC CATAACCA AAAATACCTA AATCAAAAAA ATCACCGGTT 240  
 GAGCAGGAAG GCAGAATCCT ATTAGCTATA TCAGCTATAA AAAACAAGA AATCAGCAGT 300  
 TTTAGAAAGG CAGCTGAAAT TTTAATATA CCTATCGCTA CACTACGTTA TCGTCTAAAT 360  
 CGAGTTTCTT TCGAAATGA TACTCGTGCC AATAGTTATA AAATAACTTC TAGTGAAGAG 420  
 AAATCCCTTA AAAATAGAT TCTATCACTA GATAAACGTG GAGCACCTCC TCGGCTGTGA 480  
 CACGTACGAG AAATAGCCAA TATCCTGCTT TTAAGCGTA ATACTACCTC CCCCCCTACT 540  
 ACTGTAGAGG AGAAATGGGT ATACAACCTT ACCAAGCGTA CACCTAAGCT TAAATTCTGC 600  
 TTTGCACGTC GCTACAACCTA TCACCATGCC AAGGTAGAGG ATCCTAAGGT TCTAGTACT 660  
 TAGTTTAAAG AGGTAAATAA GGTATTTCAG AAGTACGTA TAGCTTCAAG CGATATATAC 720  
 AATTTTAATA AAACGCGGTT TATAATGGCC CTAATAGCTA CAGCCAAAGT TGTTACTAGA 780

TCTAATATGC CAGCGAACT ATTTTATTA CAGCTAGAGA ACCGGGAATG CGTTACTGCC 840

【図面の簡単な説明】

【図1】 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子のプロモーター領域の制限酵素地図およびエンハンサー配列とその周辺の塩基配列を示す。

【図2】プラスミドpNAGT4およびpNAGG1-1の構築手順を示す。

【図3】QUS遺伝子のniaD遺伝子座での相対的インテグレーションパターンを示す。

【図4】 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子の各種欠失プロモーターの相対活性を示す。

【図5】エンハンサー塩基配列Bの揺らぎ部分の2塩基対を任意の塩基と置換したときのプロモーター活性を示\*

す。

【図6】エンハンサー塩基配列Eをプロモーターに導入したときのプロモーター活性を示す。

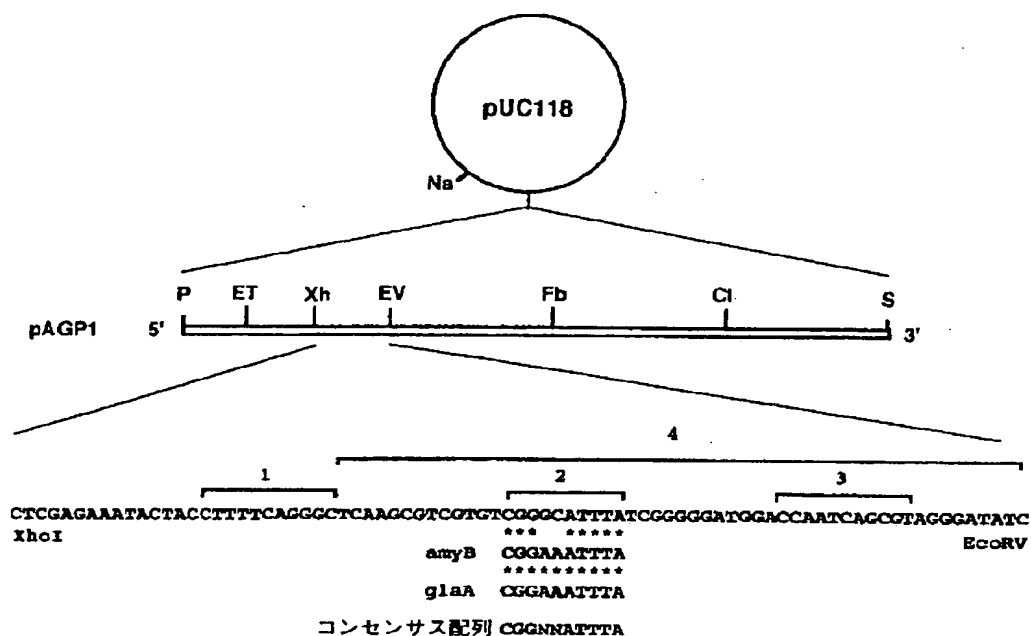
【図7】エンハンサー塩基配列Eを導入したプロモーターのノーザンブロット解析を示す電気泳動の図面代用写真である。

【図8】プラスミドpNAG136およびpNAG142の構築手順を示す。

【図9】プラスミドpNAGL136およびpNAGL142の構築手順を示す。

【図10】 $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子のniaD遺伝子座での相対的インテグレーションパターンを示す。

【図1】



Na : NaeI, P : PstI, ET : EcoT14I, Xh : XhoI, EV : EcoRV, Fb : FbaI, Cl : ClaI, S : SalI

amyB :  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 プロモーターの高ホモロジー配列

glaA : グルコアミラーゼ遺伝子 プロモーターの高ホモロジー配列

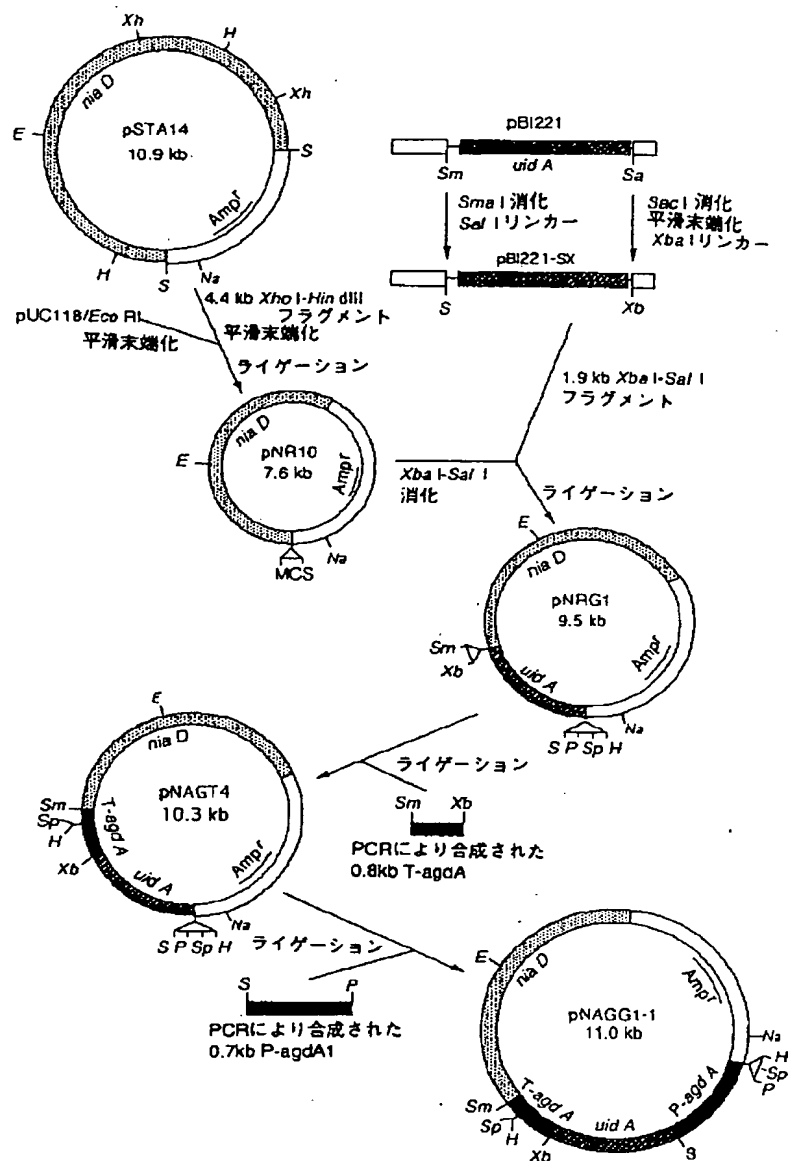
1 : P-agdA8で欠失している塩基配列

2 : P-agdA6で欠失している塩基配列 (エンハンサー配列B)

3 : P-agdA7で欠失している塩基配列 (エンハンサー配列C)

4 : エンハンサー配列B及びCを含むDNA塩基配列単位E

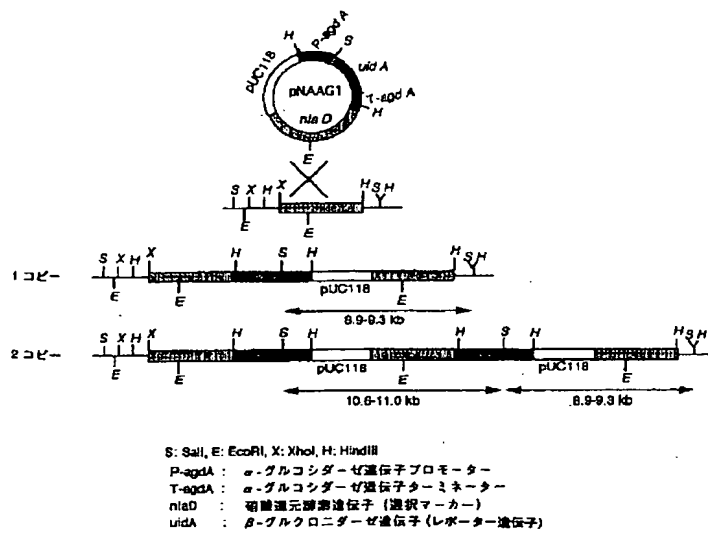
【図2】



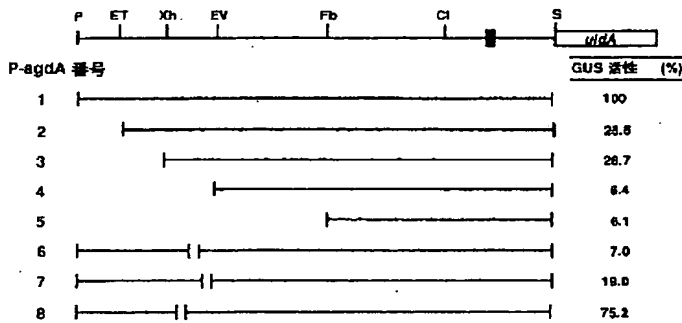
Xh: *XhoI*, H: *HindIII*, S: *SacI*, Na: *NaeI*, Sm: *SmaI*, Sa: *SacI*, Xb: *XbaI*, E: *EcoRI*, P: *PstI*, Sp: *SphI*.

P-*agdA* :  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子プロモーター  
 T-*agdA* :  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子ターミネーター  
*niaD* : 硝酸還元酵素遺伝子 (選択マーカー)  
*uidA* :  $\beta$ -グルコニダーゼ遺伝子 (レポーター遺伝子)  
*Amp* : アンピシリン耐性遺伝子  
 MCS : マルチクローニングサイト

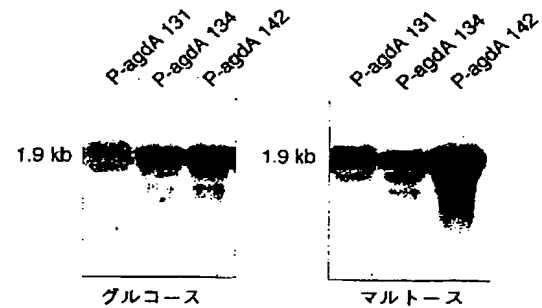
【図3】



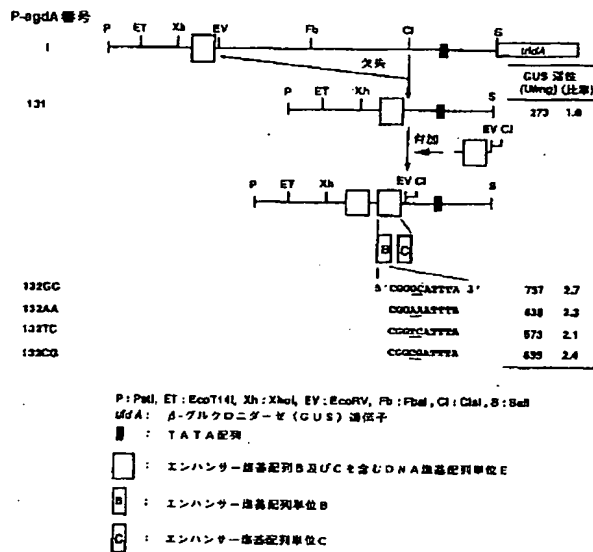
【図4】



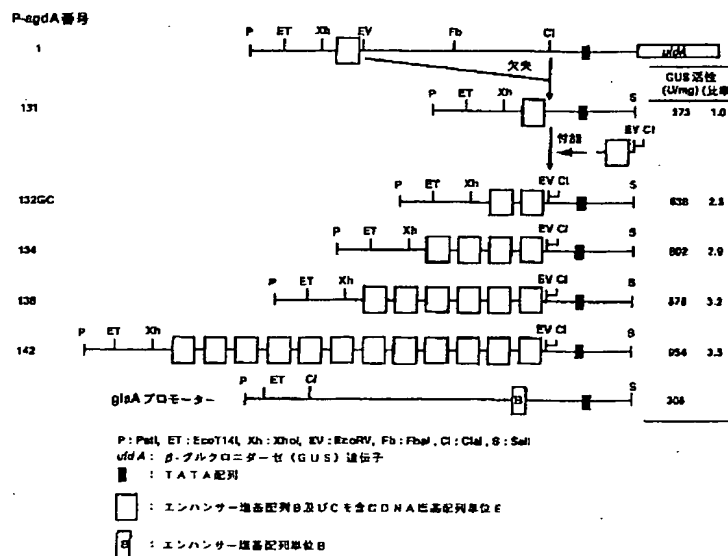
【図7】



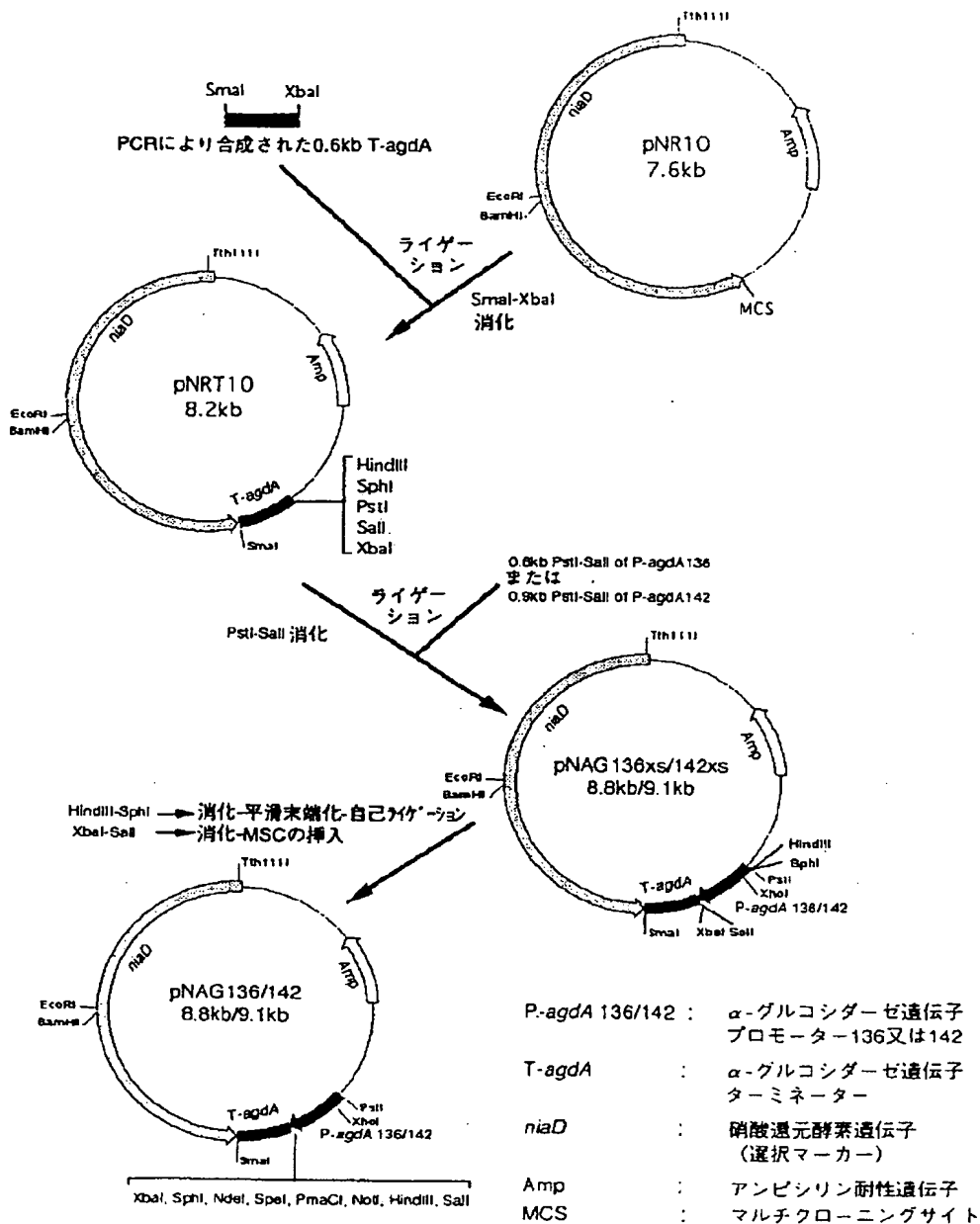
【図5】



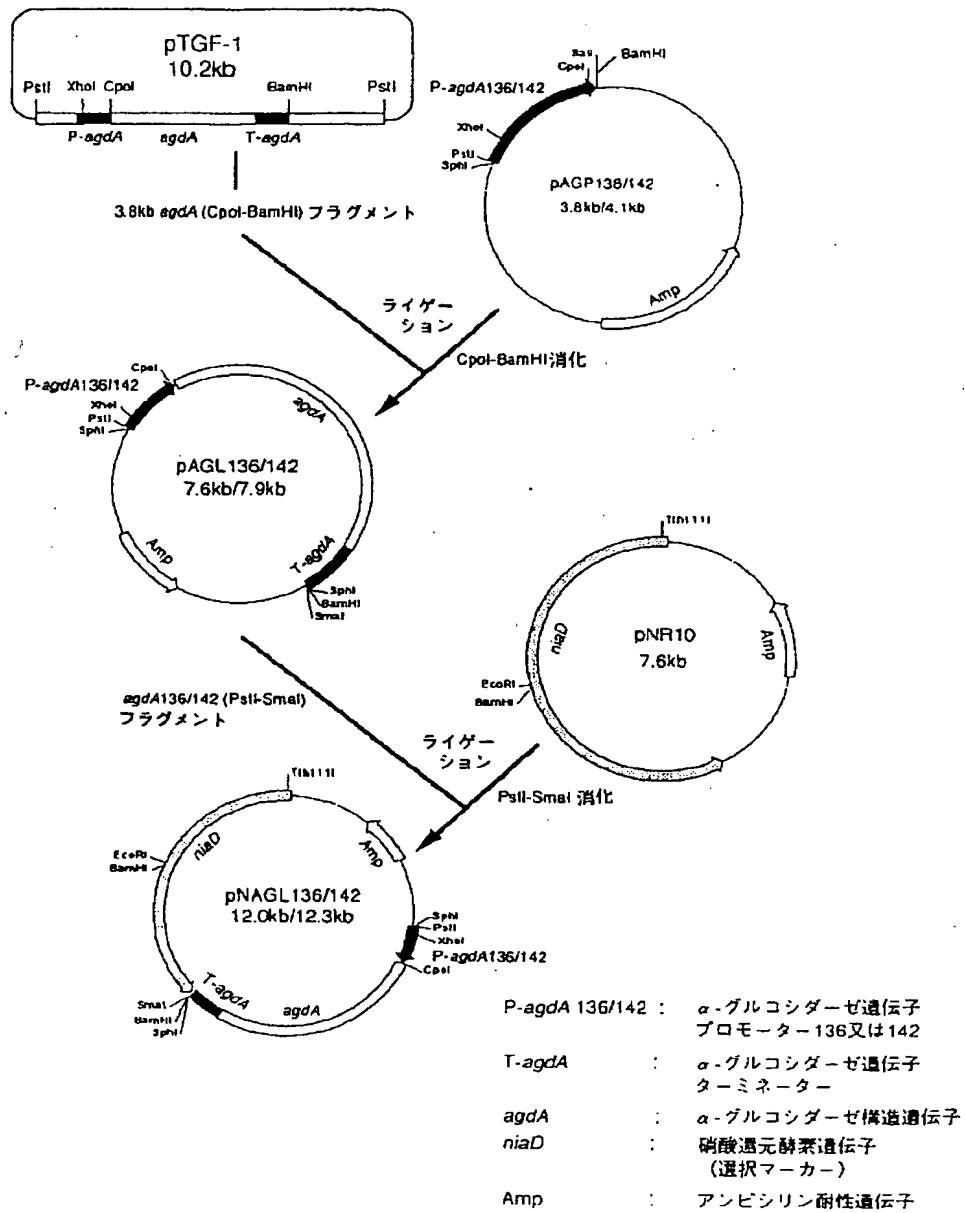
【図6】



【図8】

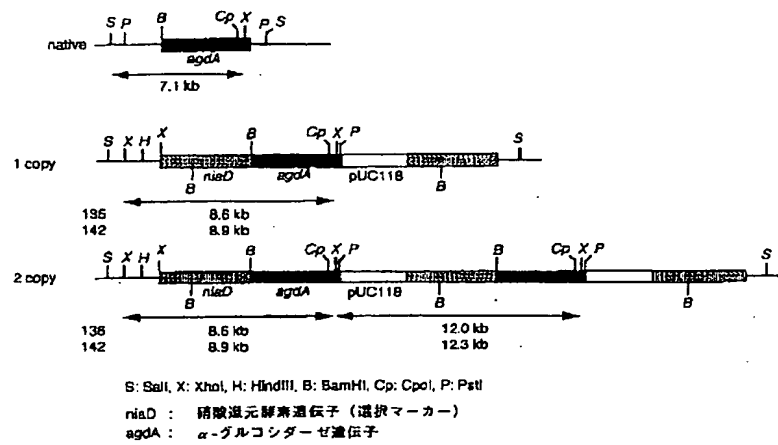


【図9】





【図10】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C 1 2 R 1:69)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 神田 晃敬  
 兵庫県西宮市今津出在家町4番9号 大関  
 株式会社総合研究所内  
 (72)発明者 布川 彌太郎  
 兵庫県西宮市今津出在家町4番9号 大関  
 株式会社総合研究所内  
 (72)発明者 五味 勝也  
 東京都北区滝野川2丁目6番R C 101

(72)発明者 北本 勝ひと  
 茨城県牛久市上柏田3丁目14番18号  
 (72)発明者 高橋 康次郎  
 東京都北区滝野川2丁目6番30号 国税庁  
 醸造試験所内  
 (72)発明者 田村 學造  
 東京都大田区山王2丁目17番12号

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**